

**Márcia Liane Klauck  
Santos**

**Determinação da Prevalência de Genes *qnr* em  
Isolados Clínicos de *Escherichia coli***

Dissertação de mestrado em Microbiologia, apresentada ao Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, sob orientação da Doutora Gabriela Conceição Duarte Jorge da Silva e co-orientação da Doutora Sónia Alexandra Leite Mendo Barroso.

## **o júri**

presidente

**Prof. Doutor António Carlos Matias Correia**

Professor Associado com Agregação da Universidade de Aveiro

**Prof. Doutora Olga Maria Rodrigues Antunes Carvalho Cardoso**

Professora Auxiliar com nomeação definitiva da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (Arguente)

**Prof. Doutora Gabriela Conceição Duarte Jorge da Silva**

Professora Auxiliar da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (Orientador)

**Prof. Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barrososo**

Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro (Co-orientador)

## **agradecimentos**

Quero deixar aqui registados os meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram para que a realização deste trabalho fosse possível.

Ao meu marido Alexandre, obrigada por estar presente na minha vida, por acreditar em mim, pelo encorajamento, pelo suporte e paciência.

À Prof. Doutora Gabriela Conceição Duarte Jorge da Silva, obrigada pela sua incansável dedicação e cuidado, na minha iniciação em Microbiologia. Por acreditar na minha capacidade e por partilhar comigo seus conhecimentos, suas opiniões e críticas, durante todo o período de elaboração de trabalhos laboratoriais e da dissertação. Pela franqueza e honestidade, pelo espírito optimista e pelo constante estímulo.

À Prof. Doutora Sónia Mendo, obrigada pela sua boa vontade e disposição imediata para ajudar, sempre que foi necessário.

À Prof. Doutora Paula Morais, obrigada pela oportunidade de poder participar nas suas aulas, pelos serviços de sequenciação e principalmente pela atenção e conselhos sobre meus estudos futuros.

Às minhas amigas e colegas de laboratório, obrigada pela constante ajuda e companheirismo.

À Cátia e à Tânia, obrigada pela ajuda no uso do software GelCompar.

Ao Prof. Doutor António Correia, coordenador do mestrado, obrigada pela ajuda na delineação do assunto de pesquisa.

Ao Doutor George Jacoby, obrigada por nos disponibilizar a estirpe bacteriana receptora para a conjugação.

Ao pessoal técnico do Laboratório da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, muito obrigada.

## resumo

A resistência aos antimicrobianos é um problema crescente no contexto clínico actual, afectando seriamente o resultado dos tratamentos das doenças infecciosas e o futuro da antibióterapia.

As quinolonas foram introduzidas na clínica em 1962. Por serem de origem inteiramente sintética, acreditava-se que as bactérias provavelmente não desenvolveriam mecanismos de resistência às mesmas. Contudo, hoje conhecem-se vários mecanismos, entre os quais as proteínas Qnr. Estas proteínas estão agrupadas em três grupos: QnrA, QnrB e QnrS. Elas protegem as topoisomerasas II da acção das quinolonas e conferem aumento de 4 a 64 vezes, da Concentração Mínima Inibitória (CMI) das mesmas. A localização plasmídica de seus determinantes genéticos aumenta a possibilidade de disseminação entre vários microrganismos. A relação das proteínas Qnr com a produção de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado (ESBLs) tem sido reportada frequentemente.

Como em Portugal a resistência às quinolonas é elevada e os estudos sobre a epidemiologia dos genes *qnr* são escassos, os principais objectivos deste trabalho foram determinar a prevalência dos genes *qnr* em isolados clínicos de *E. coli* e avaliar a sua relação genética.

Dos 220 isolados clínicos de *E. coli* recolhidos no Hospital da Universidade de Coimbra entre Novembro e Dezembro de 2007 seleccionaram-se 30 isolados para pesquisa dos genes *qnr*. Estes genes foram também pesquisados numa colecção de *E. coli* produtores de ESBLs recolhidos em 2004 no mesmo hospital. Foi apenas identificado o gene *qnrS* em 9,5% dos isolados de 2007 e em 12% dos produtores de ESBL de 2004, não tendo sido detectados os genes *qnrA* e *qnrB*. Não foi encontrada uma relação significativa entre a prevalência do gene *qnrS* e a produção de ESBLs. O estudo da relação genética por ERIC-PCR entre os isolados revelou vários padrões distintos e evidenciou que a prevalência do gene *qnrS* não está associada com a disseminação clonal. Os isolados *qnrS* positivos apresentaram plasmídeos de alto peso molecular de igual tamanho. Por conjugação, foi possível transferir o gene *qnrS* para a estirpe receptora *E. coli* J53 Az<sup>R</sup>, confirmando por PCR e observando que nos transconjugantes a CMI da ciprofloxacina aumentava 16 vezes (de 0,06 a 1 mg/L).

Em conclusão, a prevalência do gene *qnrS* em *E. coli* é baixa, mas a sua detecção e localização em plasmídeos conjugativos pode indicar uma emergência deste mecanismo de resistência às quinolonas em Portugal.

## abstract

Antimicrobial resistance is currently an increasing problem in clinic context. Its development affects seriously the treatment outcome of infectious diseases and the future of antibiotic therapy.

Quinolones were introduced in clinic context in 1962. It was believed that bacteria would probably not develop quinolone resistance mechanisms because their origin is absolutely sintetic. Nevertheless, nowadays there are many known quinolone resistance mechanisms, including the Qnr proteins. These proteins are grouped in three grups: QnrA, QnrB and QnrS. The Qnr proteins protect topoisomerases II from quinolones's action and confers 4 to 64 fold increase in Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of these drugs. The striking association of Qnr and production of Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamases (ESBLs) has often been reported.

Since in Portugal quinolone resistance is high and epidemiologic studies about *qnr* genes are rare, the main goals of this study were to determine the *qnr* prevalence in clinical isolates of *E. coli* and to evaluate their genetic relation.

Between November and December 2007, 220 *E. coli* clinical isolates were collected at the University Hospital of Coimbra. Thirty isolates were selected for screening the *qnr* genes. Additionally, they were screened in a collection of ESBLs-producing *E. coli* isolates, collected in 2004 at the same hospital. *qnrS* gene was detected in 9,5% of the isolates collected in 2007 and in 12% of ESBL-producing isolates, while *qnrA* and *qnrB* were not found. It was not observed a significant association between the prevalence of *qnrS* and the production of ESBLs. The study of genetic relationship performed by ERIC-PCR among *E. coli* isolates showed several distinct patterns and stressed that *qnrS* prevalence was not associated to clonal spread. The *qnrS* positive isolates showed high molecular weight plasmids of the same size. By conjugation, it was possible to transfer the *qnrS* gene to the receptor strain *E. coli* J53 Az<sup>R</sup>, as confirmed by PCR and by observing a 16 fold increase in MIC (from 0,06 to 1mg/L) in transconjugants.

It is concluded that *qnrS* gene prevalence in *E. coli* isolates from different origins is low but their location on conjugative plasmids may indicate an emergency of this quinolone resistance mechanism in Portugal.

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>5</b>
<b>1. RESISTÊNCIA BACTERIANA.....</b>	<b>7</b>
1. 1 A Resistência aos Antibacterianos como um Problema de Saúde Pública .....	7
1. 2 Definição de Resistência Microbiana .....	10
1. 3 Origem da Resistência Microbiana, Desenvolvimento e Disseminação de genes.....	12
1. 4 Mecanismos de Disseminação da Resistência.....	14
1. 4. 1 Elementos genéticos móveis .....	16
<b>2. RESISTÊNCIA DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> À VÁRIOS GRUPOS DE ANTIBACTERIANOS.....</b>	<b>19</b>
2. 1 Inativação Enzimática .....	19
2. 2 Modificação do Local de Ligação do Fármaco ou alvo de acção.....	19
2. 3 Diminuição da Concentração Intracelular do Fármaco.....	20
2. 3. 1 Efluxo Activo do Fármaco.....	20
2. 3. 2 Absorção Reduzida do Fármaco .....	20
2. 4 Protecção do Local de Ligação do Fármaco.....	20
<b>3. AGENTES ANTIMICROBIANOS, SUA CLASSIFICAÇÃO E SEUS PRINCIPAIS MECANISMOS DE ACÇÃO .....</b>	<b>22</b>
3. 1 Classificação dos Antimicrobianos.....	22
3. 2 Mecanismos de Acção dos Antibacterianos.....	23
3. 2. 1 Inibição da síntese da parede celular .....	24
3. 2. 2 Inibição da síntese proteica.....	24
3. 2. 3 Inibição da Síntese de DNA.....	24
3. 2. 4 Outros alvos para acção dos antibacterianos.....	25
<b>4. QUINOLONAS &amp; MECANISMOS DE RESISTÊNCIA.....</b>	<b>26</b>
4. 1 O Fármaco e a sua Actividade.....	26
4. 2 Mecanismos de Resistência às Quinolonas .....	28
<b>5. OS GENES <i>QNR</i> E AS PROTEÍNAS <i>QNR</i>.....</b>	<b>32</b>
5. 1 Genes <i>qnr</i> Identificados até ao Momento.....	32
5. 2 Origem dos Genes <i>qnr</i> .....	33
5. 3 Epidemiologia dos Genes <i>qnr</i> .....	35

5. 4 Mecanismo de Acção das Proteínas Qnr .....	39
5. 5 Avaliação da Actividade de Resistência das proteínas Qnr .....	40
5. 6 Ambiente genético dos genes qnr .....	41
5. 7 Outros Aspectos Relevantes Sobre Qnr .....	43
<b>6. OBJETIVOS .....</b>	<b>45</b>
<b>7. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>46</b>
7. 1 Isolados Clínicos .....	46
7. 2 Estirpes Bacterianas Padrão.....	46
7. 3 Conservação e Cultura das Bactérias .....	47
7. 4 Testes de Susceptibilidade aos Antibacterianos.....	47
7. 4. 1 Teste Fenotípico de Detecção de $\beta$ -lactamases de Espectro alargado - Método de Difusão em Disco .....	47
7. 4. 2 Determinação da Concentração Mínima Inibitória – Método da Microdiluição em Meio Líquido.....	48
7. 5 Selecção dos Isolados Clínicos Para Pesquisa dos genes qnrA, qnrB e qnrS .....	48
7. 6 Técnicas de Biologia Molecular.....	49
7. 6. 1 Extracção do DNA Total Bacteriano .....	50
7. 6. 2 Determinação da Concentração do DNA por Espectrofotometria .....	50
7. 6. 3 Reacção de amplificação em cadeia – PCR dos genes qnr.....	51
7. 6. 4 Estudo da Relação clonal dos isolados de <i>Escherichia coli</i> seleccionados para pesquisa dos genes qnr .....	52
7. 6. 5 Análise dos perfis obtidos por ERIC-PCR.....	53
7. 6. 6 Visualização do Produto de Amplificação.....	54
7. 6. 7 Extracção e Purificação do Produto de Amplificação em Gel de agarose .....	54
7. 6. 8 Sequenciação do Amplicão.....	55
7. 6. 9 Extracção de DNA Plasmídico .....	55
7. 6. 10 Transferência horizontal de genes – Conjugação.....	56
<b>8. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>58</b>
<b>8. 1. Dados Epidemiológicos .....</b>	<b>58</b>
8. 1. 1 Distribuição dos isolados clínicos nas áreas físicas do hospital.....	58
8. 1. 2 Distribuição dos Isolados Clínicos Conforme Produto Biológico de Origem .....	58
8. 1. 3 Distribuição dos Isolados Clínicos Segundo Faixa Etária dos Utentes Afectados e sua Relação com a Susceptibilidade à Ciprofloxacina .....	60
8. 1. 4 Distribuição dos Isolados Clínicos Segundo o Sexo dos Utentes Afectados .....	61
8. 1. 5 Susceptibilidade aos Antimicrobianos.....	62
8. 1. 6 Susceptibilidade às Quinolonas .....	66
8. 1. 7 As Quinolonas e as Infecções Adquiridas na Comunidade.....	68
<b>8. 2 Escolha dos Isolados Clínicos Para Pesquisa dos Genes qnr .....</b>	<b>69</b>
<b>8. 3 Pesquisa dos Genes qnrA, qnrB e qnrS Pela Técnica de PCR .....</b>	<b>72</b>
<b>8. 4 Análise da Sequência Parcial de Nucleótidos do Gene qnrS.....</b>	<b>77</b>

<b>8. 5 Produção de <math>\beta</math>-lactamases de Espectro Alargado Associado à Resistência às Quinolonas em Enterobacteriaceae .....</b>	<b>77</b>
<b>8. 6 Estudo da Relação Clonal dos Isolados Clínicos de Escherichia coli .....</b>	<b>81</b>
<b>8. 7 Pesquisa de Plasmídeos, Conjugação <i>in vitro</i> e determinação da Concentração Mínima Inibitória dos Transconjugantes.....</b>	<b>87</b>
8. 7. 1 Pesquisa de Plasmídeos .....	87
8. 7. 2 Conjugação <i>in vitro</i> do gene <i>qnrS</i> e determinação da Concentração Mínima Inibitória dos Transconjugantes .....	88
<b>9. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>90</b>
<b>10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>93</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS

**ATP** - Adenosina Trifosfato

**bp** – pares de bases

**CFU** – Unidades Formadoras de Colónias

**CLSI** - *Clinical and Laboratory Standart Institute*

**CMI** – Concentração Mínima Inibitória

**DNA** - Ácido Desoxirribonucleico

**ESBLs** - Beta-lactamases de Espectro Alargado

**ERIC-PCR** – *Enterobacterial Repetitive Intergenic Concensus polimerase Chain Reaction*.

**ESAC** – *European Surveillance of Antimicrobial Consunption*

**EARSS** - *European Antimicrobial Resistance Surveillance System*

**HUC** – Hospitais da Universidade de Coimbra

**INFARMED** - Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento

**IR** – *Inverted Repeats*

**MPC** – Concentração Preventiva de Mutações

**mRNA** - Ácido Ribonucleico mensageiro

**NCBI** - *National Center for Biothnecnology Information*

**OMS** - Organização Mundial da Saúde

**ORF** – *Open Reading Frame*

**PC** – Parede Celular

**PCR** – *Polimerase Chain Reaction*

**PMQR** – Resistência às Quinolonas Mediada por Plasmídeos

**Qnr** – *Quinolone Resistance Protein*

**QRDRs** – *Quinolone Resistance-detemining Regions*

**rep-PCR** – *repetitive elements Polimerase Chain Reaction* (amplificações de fragmentos de DNA repetitivos e conservados do genoma. Entre as técnicas de PCR que compartilham este princípio encontram-se BOX-PCR, REP-PCR e ERIC-PCR).

**SIDA** - Síndrome de Imunodeficiência Adquirida

**UTIs** – Infecções do tracto Urinário

## INTRODUÇÃO

A descoberta da penicilina por Fleming e sua introdução no contexto clínico durante a Segunda Guerra Mundial revolucionou a história do tratamento das doenças infecciosas. No entanto, desde logo apareceram bactérias resistentes a este antibiótico.

Nos primeiros anos após a introdução dos antibacterianos na prática clínica, o problema da resistência era mais facilmente superado que nos tempos actuais, pois a descoberta de novas classes de antibacterianos apresentava uma velocidade muito superior à actual. Outra forma de resolver o problema era alterando sua estrutura química sem que perdesse a sua actividade antibacteriana.

Vislumbrava-se nesta altura que finalmente as doenças infecciosas poderiam ser controladas. Entretanto, este sonho não perdurou por muito tempo. À medida que se foi compreendendo melhor os mecanismos de resistência, ficava mais evidente a dificuldade de enfrentar o problema. Cedo se percebeu que a velocidade com que os microrganismos desenvolviam mecanismos de resistência, ultrapassava em muito a capacidade humana de encontrar novas soluções.

Os microrganismos têm a capacidade natural de desenvolver mecanismos que permitam a sua sobrevivência em ambientes adversos, através de mutações. É a acção da selecção natural, em que só sobrevivem os organismos com competência para se adaptarem às mudanças do meio. Acredita-se que esta selecção tem vindo a ser acelerada nos últimos anos pelo uso intenso de antibacterianos tanto nos tratamentos em humanos como em veterinária e na produção de alimentos.

Além da capacidade de sofrer mutações para se adaptarem ao meio em que vivem, as bactérias têm a capacidade de trocar informação genética horizontalmente. Basicamente estão envolvidos neste processo troca de genes que conferem algum grau de vantagem de sobrevivência em ambientes que antes não eram capazes de o fazer, como por exemplo, os genes que conferem resistência aos antibacterianos.

A mudança no perfil de comportamentos observados em alguns países nos últimos anos, no que diz respeito ao uso dos antibacterianos, parece afectar directamente o desenvolvimento de mecanismos de resistência pelas bactérias.

A disseminação de microrganismos resistentes aos antibacterianos no meio ambiente tem vindo a representar outro problema na prática clínica diária. Infecções

adquiridas na comunidade, anteriormente consideradas de fácil tratamento, actualmente podem ser causadas por microrganismos resistentes e por consequência a garantia da eficiência da antibioterapia está em risco.

# **1. RESISTÊNCIA BACTERIANA**

## **1. 1 A Resistência aos Antibacterianos como um Problema de Saúde Pública**

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), desde a sua descoberta em meados do século XX, os agentes antibacterianos reduziram substancialmente as mortes causadas por doenças infecciosas. O uso dessas drogas, associado a programas de vacinação, melhoria das condições nutricionais, sanitárias e infra-estrutura urbanas, contribuíram largamente para o controlo dessas doenças, até então, consideradas intratáveis. Durante algumas décadas os agentes antibacterianos salvaram vidas, diminuíram sofrimento, ajudaram no controlo de doenças infecciosas e contribuíram para o aumento da expectativa de vida humana.

No entanto, este avanço no controlo das doenças infecciosas está em risco nos dias actuais, por causa do aparecimento e disseminação da resistência microbiana nos microrganismos (OMS).

As consequências da resistência microbiana são muito graves, pois infecções causadas por microrganismos resistentes não respondem aos tratamentos e por esta razão, resultam em longos períodos de infecção e aumentam o risco de morte. Além disso, aumentam o número de pessoas infectadas na comunidade e expõem a população em geral a contrair infecções por estirpes resistentes. Também afecta a economia porque acentua o uso de antibacterianos de última geração e de espectro alargado, geralmente mais caros que os de primeira geração (OMS).

Quando um microrganismo se torna resistente aos antibacterianos de primeira geração, o tratamento é feito com antibacterianos de segunda ou terceira geração, que além de mais tóxicos, são até 100 vezes mais caros em alguns casos. Porém, o mais alarmante é que alguns microrganismos desenvolvem resistência a todos os antibacterianos actualmente viáveis. Isto remete-nos a uma possível era pós-antibióticos, onde as mortes causadas por infecções podem vir a tornar-se uma realidade frequente (OMS).

A resistência aos agentes antibacterianos é um fenómeno biológico natural que pode ser acelerado por uma série de factores, incluindo práticas humanas. O uso de antibacterianos de forma indiscriminada leva os microrganismos a adaptarem-se e sobreviverem através de processos de selecção natural. Os que sobrevivem em ambientes contaminados com agentes antibacterianos contém genes de resistência que podem ser

transferidos para outros microrganismos (OMS).

As bactérias são particularmente eficientes no desenvolvimento de resistências porque se replicam num período de tempo muito curto e são capazes de disseminar os genes da resistência para outras bactérias através de mecanismos específicos como transformação, transdução e conjugação (OMS).

Actualmente há vários factores que contribuem para a aceleração do desenvolvimento da resistência aos agentes antibacterianos. Entre eles destacam-se:

- Poluição e degradação ambiental, que traz mudanças climáticas, que por sua vez desestabilizam os nichos ecológicos e aumentam as doenças infecciosas disseminadas por vectores, por exemplo, os insectos;
- Aglomeração das populações nos centros urbanos em associação com a ausência de infra-estrutura urbanas. Um grande número de pessoas vivem em condições de pobreza extrema sem acesso a educação, informação, saúde e trabalho o que acarreta a proliferação de doenças infecciosas;
- Mudanças demográficas como envelhecimento da população, resultando no aumento de intervenções em nível hospitalar que acaba por expor mais as pessoas a patógenos altamente resistentes;
- Pandemia de Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA) que resultou no aumento significativo da população de imunodeficientes;
- Recrudescimento de doenças antigas como malária e a tuberculose (a tuberculose hoje afecta em torno de um terço da população mundial);
- A globalização que facilitou a mobilidade dos indivíduos, aumentando a velocidade de disseminação de doenças infecciosas e das estirpes resistentes;
- Uso indiscriminado e em larga escala de agentes antibacterianos, quer em humanos (tratamento e profilaxia), quer em animais (promotores de crescimentos e/ou profilaxia (OMS)).

Entre outros factores relacionados com resistência antimicrobiana está o uso inadequado dos antibacterianos pelas pessoas. Por exemplo, muitas pessoas acreditam que medicamentos mais recentes e mais caros são mais eficientes que os de primeira geração e usam-nos muitas vezes desnecessariamente. Este comportamento estimula a selecção dos mecanismos de resistência aos medicamentos mais recentes, assim como aos mais antigos. Adicionalmente, muitas vezes esquecem-se de tomar os antibacterianos nos horários

indicados, criando assim, ambientes propícios à adaptação dos microrganismos (OMS).

A auto-medicação é outro factor que contribui para a resistência bacteriana. Isto é explicado pelo facto das pessoas usarem antibacterianos em situações inadequadas, em doses erradas e por um período de tempo impróprio. Normalmente, cessam o uso assim que os sintomas abrandam, sem terem necessariamente eliminado o patogéneo. A auto-medicação é encorajada pela propaganda directa às pessoas através dos meios de comunicação modernos e pela facilidade de aquisição dos antibacterianos sem receita médica (OMS).

A insegurança por parte dos profissionais em relação ao diagnóstico é outro factor de uso exagerado dos antibacterianos. Geralmente os médicos são pressionados pelas pessoas a prescreverem antibacterianos e como não têm meios de diagnóstico precisos disponíveis, acabam por prescrever os medicamentos para se sentirem seguros. Em muitas situações, os próprios pacientes exigem a prescrição dos antibacterianos (OMS).

Em alguns países, a baixa qualidade dos antibacterianos (mal formulados, fora do prazo de validade, etc) também é determinante para o desenvolvimento da resistência (OMS).

Os hospitais são outro elemento crítico para o desenvolvimento da resistência microbiana mundialmente. É uma combinação perigosa de longos tratamentos com antibacterianos, patogéneos resistentes e infecções cruzadas, além de pacientes susceptíveis e muitas vezes imunocomprometidos.

<http://www.who.int/medicacentre/factsheets/>

No sentido de contornar o problema do uso indiscriminado dos antibacterianos que consequentemente conduz à resistência aos mesmos, foram criados alguns programas de vigilância ao nível mundial. Entre eles destacamos o *European Surveillance of Antimicrobial Consumption* (ESAC – criado em 2001) e o *European Antimicrobial Resistance Surveillance System* (EARSS – criado em 1999).

Um comportamento comum observado entre a maioria dos países participantes destes programas é a mudança do uso de antibacterianos mais antigos e de baixo espectro para os mais recentes e de amplo espectro.

Segundo os dados do ESAC, Portugal está em quarto lugar entre os países que têm maior consumo de antibacterianos em nível de ambulatório (tem 26 participantes). Portugal

teve em 2006, uma média de consumo de 22,75 Doses Diárias Definidas por 1000 habitantes (Tabela nº 1).

Antibacterianos de uso sistémico	
Beta-lactâmicos-penicilinas.....	11,58
Macrólidos, lincosamidas e	
Streptograminas.....	3,98
Quinolonas.....	2,92
Outros beta-lactamâmicos.....	2,72
Tetraciclínas.....	0,90
Sulfonamidas e trimetoprima.....	0,51
Outras classes.....	0,15
<b>Total</b>	<b>22,75</b>

Tabela nº 1: Uso de antibacterianos sistémicos em Portugal a nível de ambulatório, no ano de 2006. O uso dos antibacterianos é expresso em Doses Diárias Definidas (DDD) por 1000 habitantes. [http://www.esac.ua.ac.be/main.aspx?c=\\*ESAC2&n=50039](http://www.esac.ua.ac.be/main.aspx?c=*ESAC2&n=50039)

Como seria esperado, também no que diz respeito à resistência microbiana, o país está entre os dez primeiros colocados com maior percentagem de microrganismos resistentes (dados do EARSS - [http://www.rivm.nl/earss/result/Monitoring\\_reports/Annual\\_reports.jsp](http://www.rivm.nl/earss/result/Monitoring_reports/Annual_reports.jsp)).

## 1. 2 Definição de Resistência Microbiana

Segundo Aarestrup (2006), o termo “resistência microbiana” é relativo. Existem inúmeras definições com base em diferentes critérios (genéticos, bioquímicos, microbiológicos e clínicos) e não são necessariamente sobrepostos. As duas definições mais comumente usadas têm bases em critérios microbiológicos (resistência *in vitro*) e clínicos (resistência *in vivo*).

De acordo com a definição microbiológica, uma estirpe é definida como resistente se ela cresce na presença de maiores concentrações do antibacteriano comparado com uma estirpe filogeneticamente relacionada (mesma espécie ou género). Com base no critério clínico, uma estirpe é definida como resistente quando sobrevive ao tratamento com um fármaco antibacteriano (Aarestrup et al, 2006).

A resistência pode ser quantificada em condições laboratoriais através da determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de um dado fármaco. CMI é a menor concentração da droga que inibe completamente o crescimento de um microrganismo. Uma estirpe é definida como resistente, intermédia ou sensível a um dado antibacteriano baseado no *breakpoint* microbiológico ou clínico. *Breakpoint* tem como base a distribuição da CMI para um dada espécie de bactérias com ocorrência de resistência quando são observados CMIs maiores em comparação com a população selvagem da espécie em questão. *Breakpoint* clínico é definido considerando não somente a distribuição da CMI para uma dada espécie, mas também parâmetros *in vivo*, como distribuição das bactérias no hospedeiro, farmacocinético e farmacodinâmica do fármaco e a correlação das CMIs com o resultado clínico final. Este último é usado quando o teste da susceptibilidade antimicrobiana é realizado em laboratórios clínicos com a finalidade de prover informações aos médicos na escolha do fármaco apropriado (Aarestrup et al, 2006).

A resistência pode ser intrínseca ou adquirida. A intrínseca está relacionada com a estrutura funcional específica das bactérias, permitindo a tolerância a uma dada classe de antibacterianos por todos os membros de um grupo de bactérias (espécie, género, ou até mesmo um grupo maior). De um modo mais apurado, isso deve ser referenciado como uma insensibilidade desde que ocorra em bactérias que nunca foram sensíveis ao agente antibacteriano. Esta insensibilidade ou sensibilidade reduzida pode ocorrer devido à baixa afinidade do fármaco pelo local de ligação na bactéria, inacessibilidade do fármaco ao interior da bactéria, efluxo activo do fármaco ou produção inata de enzimas que activam o fármaco (Aarestrup et al, 2006).

A resistência adquirida é a maior ameaça à saúde humana e animal porque dá origem à resistência e à disseminação em populações bacterianas normalmente sensíveis e consequentemente leva ao fracasso das terapias antibacterianas. A resistência adquirida é uma característica associada a somente uma estirpe de uma dada espécie ou género de bactérias. A aquisição da resistência ocorre através de uma mudança genética no genoma bacteriano, o que pode dar-se através de mutação (resistência endógena) ou aquisição horizontal de informação genética externa (resistência exógena). A resistência também pode resultar da combinação destes dois eventos mencionados. A resistência exógena pode ser secundária à transformação, transdução ou conjugação (Aarestrup et al, 2006).

As consequências da transformação e transdução na disseminação da resistência



microbiana estão limitadas às bactérias pertencentes ao mesmo gênero ou espécie. A conjugação provavelmente é o meio mais importante da disseminação da resistência microbiana, pois os genes da resistência estão muitas vezes localizados em elementos genéticos móveis conjugativos como plasmídeos e transposões. Numa situação em que um microrganismo apresenta resistência a dois agentes bacterianos distintos, mas por um mesmo mecanismo bioquímico de resistência, a definição é dada como resistência cruzada. Pode ocorrer entre fármacos da mesma classe, ou entre classes distintas. Efluxo activo inespecífico de fármacos, ou locais de ligação sobrepostos (em comum) podem ser a causa deste fenómeno (Aarestrup et al, 2006).

A resistência cruzada deve ser distinguida da co-resistência, também designada resistência associada, a qual ocorre através de coexistência de genes ou mutações na mesma estirpe, cada uma conferindo resistência a uma classe distinta de antibacterianos (Aarestrup et al, 2006).

A aquisição da resistência antibacteriana através da transferência de genes pode ser estimulada, em alguns casos, pela presença de agentes antibacterianos em concentrações sub-inibitórias no ambiente. Independentemente do efeito do agente antibacteriano na transferência dos genes, a exposição das bactérias aos agentes antibacterianos selecciona genótipos de resistência por mutação ou transferência horizontal, permitindo-os tornarem-se predominantes entre a população de bactérias. Essa situação comumente referida como selecção antimicrobiana natural ocorre em humanos e em animais durante terapias com antibacterianos assim como em ambientes (hospitais, reservas de água e etc.) como consequência do uso intensivo dos agentes antibacterianos (Aarestrup et al, 2006).

### **1. 3 Origem da Resistência Microbiana, Desenvolvimento e Disseminação de genes**

De acordo com Aarestrup (2006), a velocidade com que a resistência microbiana surgiu, desenvolveu e disseminou mundialmente, demonstra a grande habilidade que bactérias têm de se adaptarem.

A origem dos genes da resistência microbiana é desconhecida, mas acredita-se que os microrganismos do ambiente, incluindo os produtores inatos de agentes antimicrobianos, são uma importante fonte primária. Foi especulada a possibilidade de os

microrganismo que vivem nas imediações dos micróbios produtores de antimicrobianos, terem adquirido genes de resistência dos mesmos e terem desenvolvido a capacidade de sobreviverem neste ambiente inóspito. Esta teoria está suportada pela similaridade genética e bioquímica entre determinantes genéticos de resistência encontrados nos microrganismos produtores de agentes antimicrobianos e em bactérias Gram-positivo e Gram-negativo, largamente disseminados. Mutações nos próprios genes do genoma bacteriano são provavelmente a causa de vários determinantes de resistência (Aarestrup et al, 2006).

Para além disto, Ácido Desoxirribonucleico (DNA) de microrganismos produtores de antibacterianos foi encontrado em preparados de antimicrobianos destinados ao uso humano e animal. Portanto, os próprios antimicrobianos podem ter proporcionado os genes da resistência e o ambiente selectivo. Isso implicaria que a evolução dos genes originais para os genes de resistência, hoje observados em agentes patogéneos, teria acontecido durante a era dos antibacterianos, em somente meio século (Aarestrup et al, 2006).

Embora a selecção evolutiva e a disseminação dos determinantes genéticos de resistência tenham acontecido durante muito tempo, em bactérias do ambiente, o uso global de preparados antibacterianos contendo genes de resistência associados, teve um papel vital na aceleração da evolução e disseminação de fenótipos de resistência importantes nas últimas décadas (Aarestrup et al, 2006).

Mesmo havendo semelhanças entre os genes de resistência observados nos micróbios produtores de agentes antibacterianos e os genes de resistência das bactérias de isolados clínicos, há diferenças acentuadas nas sequências de DNA destes organismos, quando comparados entre si. Isso implica necessariamente, um longo processo de evolução de genes com origem nos organismos produtores de antibacterianos para os genes de resistência hoje observados, em que ocorreram mutações sequenciais, cada uma conferindo à bactéria uma vantagem sobre a sua ancestral. Pois em teoria, a evolução de um gene é um processo de mutações isoladas que ocorrem com uma certa frequência. Esta mutação se auto-estabelece na população de bactérias quando ela constitui uma vantagem para a bactéria em comparação com a sua antecessora (Aarestrup et al, 2006).

Este modelo simples é possível, embora pouco provável, dado o enorme número de bactérias existentes, a escala de tempo longa do processo de evolução e o curto tempo de geração das bactérias (Aarestrup et al, 2006).

É pouco provável que a transferência de genes de resistência tenha ocorrido

directamente dos microrganismos produtores de agentes antibacterianos para as bactérias comensais e/ou patogêneas ao Homem. Acredita-se que houveram hospedeiros intermediários, entre as quais, as bactérias até agora incultiváveis (Aarestrup et al, 2006).

Não obstante, a evolução dos genes originais provenientes dos microrganismos produtores de antibacterianos para os genes de resistência hoje identificados em bactérias patogêneas para o Homem, mesmo através de hospedeiros intermediários, requer um grande número de mutações ocorrendo em condições ambientais favoráveis (Aarestrup, 2006).

Segundo Canas (1998), como as mutações são eventos demasiadamente raros para servirem de base única à variabilidade genética, as bactérias desenvolveram processos de transferência horizontal de genes. Neste processo, chamado de recombinação homóloga, há trocas de porções de DNA, onde uma bactéria receptora recebe um fragmento de DNA de outra bactéria dadora. A transferência de material genético pode ser feita por três mecanismos: transformação, transdução e conjugação.

Enquanto é discutível se a evolução dos genes de resistência das bactérias ocorreu durante um longo período de tempo ou se é um evento recente, não há dúvidas que a rápida disseminação dos genes de resistência entre diferentes bactérias, é um evento evolucionário muito recente (Canas et al, 1998)

Esta disseminação ocorreu durante a era dos antibióticos como uma consequência da transferência horizontal de genes, mediado por diversos elementos genéticos móveis como os plasmídeos, transposões e integrões (Canas et al, 1998).

Alguns elementos genéticos móveis não se transferem efectivamente para todas as espécies de bactérias. No entanto, genes de resistência idênticos têm sido identificados em diferentes contextos genéticos, indicando que podem fazer parte de diferentes vectores de DNA (Canas et al, 1998).

#### **1. 4 Mecanismos de Disseminação da Resistência**

A troca horizontal de material genético desempenha um importante papel na evolução dos procariotas. A aquisição de genes de outro organismo é uma via eficiente para adquirir novas capacidades, permitindo a adaptação a novos ambientes ou ambientes em mudança. São três os principais processos de transferência horizontal: transformação, transdução e conjugação (Figura nº 1).

A **transformação** consiste na captação e introdução de segmentos de DNA, realizado pelas bactérias. Este DNA está livre, presente no meio ambiente e provém de outras células. A transformação natural é um mecanismo que foi observado somente em algumas espécies de bactérias como *Haemophilus* e *Neisseria*. Nunca foi descrito em membros da família *Enterobacteriaceae*. A transformação não ocorre em qualquer bactéria, pois exige um estado fisiológico particular da bactéria, chamado estado de competência. As bactérias ditas competentes, secretam para o meio exterior um factor proteico que, ao fixar-se a um receptor parietal específico, vai activar a expressão de 8 a 10 genes, cujos produtos estão envolvidos no processo de transformação (Canas et al, 1998).

A **transdução** é um fenómeno de transferência de genes mediada por bacteriófagos. A frequência de formação de partículas transdutoras é muito baixa, na ordem de uma partícula para  $10^6$  partículas virais. Quando o bacteriófago que contém a partícula transdutora encontra uma bactéria sensível irá introduzir o segmento de DNA proveniente da outra bactéria que a gerou. O segmento de DNA bacteriano que é transportado por uma partícula transdutora é seleccionada apenas pelo tamanho e, por consequência, qualquer dos caracteres da bactéria dadora pode ser transferido. Este segmento de DNA pode sofrer recombinação homóloga, caso encontre uma sequência homóloga de DNA (Canas et al, 1998).

A **Conjugação** é a transferência horizontal de genes por contacto directo entre as células. Foi descoberta em 1946 por Lederberg e Tatum. Na conjugação a transferência de genes é unidireccional. Os genes são transferidos de uma bactéria dadora (F+) para uma bactéria receptora (F-). Cruzamentos entre bactérias F+ e F- mostram que o carácter F+ é transferido para a estirpe F- com uma frequência de quase 100%. Desta maneira a estirpe F- transforma-se em F+ e passava a ter a capacidade de dar genes a outra bactéria. No entanto, a frequência de transferência não é igual para todos os genes. Por exemplo, a transferência dos genes da biossíntese de um aminoácido é, normalmente, na ordem de uma para  $10^7$  células receptoras (Canas et al, 1998).

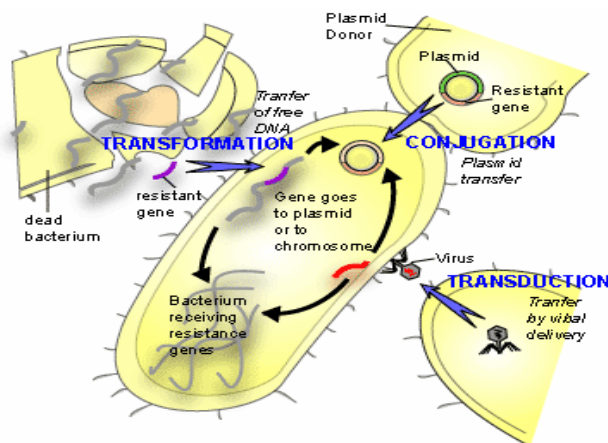


Figura nº 1: Esquema representativo dos processos de transferência genética horizontal: Transformação, conjugação e transdução. ([www.scq.ubc.ca/attack-of-the-superbugs-antibiotic-resistance](http://www.scq.ubc.ca/attack-of-the-superbugs-antibiotic-resistance))

#### 1. 4. 1 Elementos genéticos móveis

A disseminação de mecanismos de resistências é mediada pelos elementos genéticos móveis como os plasmídeos, transposões e integrões.

**Plasmídeos:** De acordo com Canas (1998), os plasmídeos são definidos como DNA extra-cromossomal que se replica de forma autónoma e são transmissíveis de forma estável à nova geração. Muitos apresentam a forma circular, mas também podem ser lineares e têm tamanho variável de 300pb a 2.400 Kb. O número de cópias de um plasmídeo por célula pode ser restringido ou não.

A existência de plasmídeos não é fundamental para a bactéria, no entanto, podem conferir-lhe novas funções que podem ser vantajosas para a sua sobrevivência. Os plasmídeos podem transportar genes que codificam a resistência aos agentes antibacterianos, factores de virulência, enzimas que degradam substratos complexos, entre outros (Canas et al, 1998).

Conforme Aarestrup (2006), um grande número de diferentes plasmídeos foram identificados em bactérias. Eles provavelmente são os mediadores mais importantes da transferência horizontal de genes entre a população de bactérias.

Classificações anteriores dividiam os plasmídeos em diferentes grupos de incompatibilidade (Inc), onde plasmídeos de um mesmo Inc não eram capazes de coexistir na mesma célula. Sequências totais de plasmídeos têm revelado um grau elevado de instabilidade e *crossover* em diferentes tipos de plasmídeos. Muitos deles exibem sequências de DNA em estruturas de mosaicos com origem em diferentes plasmídeos,

transposições e DNA de fagos. Sequências inseridas desempenham um papel importante na evolução dos plasmídeos como mediadores da recombinação. Alguns plasmídeos podem ser mantidos por apenas um grupo de bactérias, enquanto outros têm uma vasta gama de hospedeiros. Portanto, são ainda classificados de acordo com o seu espectro que pode ser largo ou baixo (Aarestrup et al, 2006).

Segundo Canas (1998), os plasmídeos são ditos conjugativos quando possuem genes que codificam as funções para a sua transferência, como por exemplo, o pili sexual que é um elemento essencial para a primeira etapa da conjugação, onde ocorre a união física entre as duas bactérias.

Os plasmídeos não conjugativos não possuem as funções para a sua transferência. Para serem passados para outras estirpes de bactérias, têm de ser mobilizados por plasmídeos conjugativos (Canas et al, 1998).

De acordo com Aarestrup (2006), plasmídeos conjugativos desenvolveram a capacidade de conter um grande número de determinantes genéticos de resistência microbiana simultaneamente. Isto aponta para um fenómeno importante - os plasmídeos que codificam para fenótipos de multirresistência antimicrobiana são mantidos e disseminados por pressão selectiva apenas de um agente antimicrobiano. A consequência deste facto é que, as tentativas de amenizar o problema da resistência através da restrição do uso dos agentes antimicrobianos não atingirão o resultado almejado, a menos que, seja restringido o uso de todos os agentes antimicrobianos (Aarestrup et al, 2006).

**Tranposões:** conforme Canas (1998), a organização dos genes do genoma bacteriano não é estável. Existem segmentos de DNA móveis (os transposões) que podem saltar de um ponto para o outro do genoma bacteriano, levando consigo alguns genes que resultam em modificações na estrutura do DNA genómico. Os transposões não possuem propriedades auto-replicativas e para se perpetuarem necessitam de replicões (fragmentos de DNA de cadeia dupla servidos por uma única origem de replicação e que transportam os genes necessários para a sua auto-replicação). A transposição de um segmento de DNA requer a enzima transposase e extremidades com sequências de repetição invertida (SRI). Não necessita de homologia entre o transposão e o local do genoma onde ele vai se inserir (Canas et al, 1998).

**Integrões:** os integrões não são conhecidos como elementos capazes de se transferir horizontalmente de forma independente. Estão localizados com frequência em elementos móveis conjugativos como plasmídeos (Canas et al, 1998).

Integrões são sistemas de engenharia genética naturais que capturam e incorporam *open reading frames* (OFR) e as convertem em genes funcionais. Há quatro tipos de integrões identificados com base na sequência das integrases: classe 1, classe 2, classe 3 e superintegrões. Os da classe 1 são mais comuns nas bactérias clínicas (Canas et al, 1998).

## **2. RESISTÊNCIA DE *Escherichia coli* À VÁRIOS GRUPOS DE ANTIBACTERIANOS**

*E. coli* é o patogéneo de maior importância para o Homem e consequentemente, tratamentos com antibacterianos são indicados frequentemente para o tratamento de infecções causadas por este patogéneo. A resistência aos antibacterianos, lamentavelmente, é uma consequência do uso intenso destes fármacos (Aarestrup et al, 2006).

A capacidade das *E. coli* de dispor concomitantemente resistência a vários grupos de antibacterianos tem sido relatada nos últimos anos. Estudos realizados por Stuar Levy demonstraram que as *E. coli* são capazes de desenvolver múltiplas resistências a antibacterianos de uma só vez, o que inicialmente era atribuído à acumulação sequencial de determinantes cromossómicos da resistência e aos determinantes genéticos móveis (Aarestrup et al, 2006).

Conforme Aarestrup (2006), os mecanismos bioquímicos de resistência aos antibacterianos podem ser classificados em vários grupos: inactivação enzimática do fármaco, alteração do local de ligação ou de acção do fármaco, diminuição da absorção do fármaco por efluxo activo ou por absorção reduzida. Outros mecanismos como a protecção e superprodução dos locais de ligação são menos comuns e sua importância está limitada a certas classes de antibacterianos.

O mais notável, segundo White (2005), é que *E. coli* pode exhibir todos estes mecanismos de resistência referidos, concomitantemente.

### **2. 1 Inactivação Enzimática**

É o mecanismo de resistência mais importante dos  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos e fenicois. As enzimas produzidas pelas bactérias inactivam o núcleo activo das drogas, resultando na perda da actividade antibacteriana. Esta inactivação acontece pela clivagem ou adição de uma molécula química ao núcleo activo da droga. Geralmente está associada a elementos genéticos móveis (White et al, 2005).

### **2. 2 Modificação do Local de Ligação do Fármaco ou alvo de acção**



O local de ligação pode ser estruturalmente modificado, assim o fármaco não pode ligar-se à bactéria e exercer a sua actividade. Este mecanismo de resistência pode estar associado a quase todas as classes de antibacterianos (White et al, 2005).

## **2. 3 Diminuição da Concentração Intracelular do Fármaco**

### **2. 3. 1 Efluxo Activo do Fármaco**

Este é um mecanismo dependente de energia usado pelas células bacterianas para exportar metabólitos e substâncias tóxicas, incluindo os fármacos. As proteínas transmembranares são mediadoras deste processo. Algumas têm alta especificidade de substratos e somente algumas delas conferem resistência aos agentes antibacterianos.

As proteínas que não têm especificidade de substratos estão associadas com a resistência a múltiplas drogas, pois actuam no efluxo de vários fármacos (White et al, 2005).

### **2. 3. 2 Absorção Reduzida do Fármaco**

É um fenómeno de grande importância principalmente em bactérias Gram-negativo. Nestes microrganismos os fármacos hidrofílicos entram pelas porinas e os fármacos hidrofóbicos entram por difusão pela camada fosfolipídica da parede celular (PC). Mutações que levam à diminuição da expressão, diminuição do tamanho ou perda das porinas têm sido evidenciadas como factores de resistência antibacteriana adquirida pelas bactérias às várias classes de antibacterianos (White et al, 2005).

## **2. 4 Protecção do Local de Ligação do Fármaco**

Resistência conferida por protecção do local de ligação do fármaco foi relatada para tetraciclins e mais recentemente para quinolonas. Baixo nível de resistência as quinolonas, mediado por plasmídeos, atribuível à protecção da DNA-girase e topoisomerase IV, foi relatado recentemente na família *Enterobacteriaceae*. As proteínas responsáveis por este mecanismo de baixo nível de resistência as quinolonas (QnrA, QnrB e QnrS) pertencem à família de proteínas em cuja sequência se repetem os pentapéptidos (Robicsek A., et al, 2006<sup>a</sup>).

Vários mecanismos de resistência que conferem resistência para a mesma classe de antibacterianos são frequentemente encontrados numa mesma bactéria. A combinação de vários mecanismos que permitem às bactérias sobreviverem a altas concentrações de drogas alcançadas no corpo humano ou animal durante a terapia (White et al, 2005).

### **3. AGENTES ANTIMICROBIANOS, SUA CLASSIFICAÇÃO E SEUS PRINCIPAIS MECANISMOS DE ACÇÃO**

Os termos antimicrobiano e antibiótico não podem ser usados com o mesmo sentido. Essa razão se encontra na etimologia das palavras. O termo antimicrobiano (do grego anti=contra, mickros=pequeno e bios=vida) significa que são substâncias contra a vida de microrganismos. O termo antibiótico foi usado pela primeira vez em 1889 pelo biólogo francês P. Vuillemin para descrever a destruição de um organismo pelo outro. Em 1941, este termo foi introduzido como substantivo pelo microbiologista S. A. Waksman que o definiu como substância química que é produzido por um microrganismo e que tem a capacidade, em solução diluída, de inibir selectivamente o crescimento e até mesmo, destruir outro microrganismo. De acordo com essa definição as substâncias de origem sintética como as quinolonas, não podem ser indicadas como antibióticos (Aarestrup et al, 2006, White et al, 2005).

Só podem ser administrados sistematicamente fármacos em humanos ou animais, com toxicidade selectiva, afectando mais o microrganismo patogéneo que o hospedeiro. Os agentes antimicrobianos com maior toxicidade selectiva são os que afectam as estruturas dos microrganismos (ex. parede celular) e vias metabólicas (biossíntese de ácido fólico) que não estão presentes em células eucariotas. Ao contrário, os agentes antimicrobianos que agem no DNA têm mais probabilidade de induzir efeitos tóxicos no hospedeiro - humanos e animais (Aarestrup et al, 2006, White et al, 2005).

#### **3. 1 Classificação dos Antimicrobianos**

Agentes antimicrobianos podem ser classificados segundo vários critérios. Com base no microrganismo alvo, podem ser classificados como antivirais, antibacterianos, antifúngicos e antiparasitários. No entanto, é de se notar que as bactérias e protozoários podem ser susceptíveis ao mesmo fármaco. Ao contrário, os vírus e fungos não são sensíveis a nenhum antibacteriano em concentrações terapêuticas normais (Aarestrup et al, 2006, White et al, 2005).

Agentes antibacterianos incluem uma vasta lista de substâncias que diferem entre si, em estrutura química e modo de acção. Classificações para este fim têm base na

estrutura química das substâncias. Cada classe de antibacteriano tem a sua estrutura do núcleo da molécula característica que é responsável pela actividade do fármaco. A adição ou subtracção de grupos químicos desta estrutura dá origem aos vários membros da classe e influencia no espectro da sua actividade, na farmacodinâmica e na toxicidade (Aarestrup et al, 2006, White et al, 2005).

Com base na variedade de grupos bacterianos susceptíveis, os agentes bacterianos podem ser classificados em largo, intermédio e de baixo espectro. São considerados antibacterianos de largo espectro os que apresentam actividades antibacterianas a uma variedade de espécies bacterianas, incluindo Gram-positivo, Gram-negativo, aeróbios e anaeróbios. Antibacterianos com espectro baixo são normalmente activos contra um único grupo de bactérias, como por exemplo organismos Gram-positivo (Aarestrup et al, 2006, White et al, 2005).

Antibacterianos que matam as bactérias são classificados como bactericidas, enquanto os que inibem o crescimento das bactérias são bacteriostáticos. O tipo de actividade antibacteriana de um fármaco depende principalmente da maneira como ela se liga ao local de ligação (Aarestrup et al, 2006, White et al, 2005).

Normalmente os fármacos bactericidas efectuam ligações irreversíveis ou de alta afinidade com as bactérias, enquanto os fármacos bacteriostáticos formam ligações instáveis. Essa classificação é muito arbitrária uma vez que um mesmo fármaco pode ter actividade bactericida e bacteriostática, dependendo da sua concentração e do tipo, quantidade e fase de crescimento das bactérias; assim como das condições ambientais em que a experiência é avaliada. Por exemplo, aminoglicosídeos são bactericidas, mas têm pouca acção sobre bactérias anaeróbias. Isso é uma distinção muito importante na clínica pois drogas bacteriostáticas têm efeito mais lento e a sua eficácia depende da resposta imunitária do hospedeiro. Com consequência, o uso dos bacteriostáticos não é indicado para pacientes imunodeficientes e doenças agudas que ameaçam a vida (Aarestrup et al, 2006, White et al, 2005).

### **3. 2 Mecanismos de Acção dos Antibacterianos**

A actividade antibacteriana ocorre através da inibição das vias bioquímicas que estão envolvidas na biossíntese dos componentes vitais para a célula bacteriana. Os três

principais alvos dos agentes antibacterianos nas bactérias são: parede celular, proteínas e biossíntese de ácidos nucleicos (Aarestrup et al, 2006, White et al, 2005).

### **3. 2. 1 Inibição da síntese da parede celular**

A parede celular é um importante componente das bactérias, pois confere-lhes protecção mecânica e uma superfície sólida para as proteínas e apêndices necessários para a adesão celular, infecção do hospedeiro, mobilidade e transferência horizontal de genes. São três as fases mais importantes da síntese da PC bacteriana: a fase plasmática, a fase membranar e a fase extracitoplasmática. A síntese da parede celular pode ser inibida durante qualquer uma dessas fases por agentes antibacterianos (Aarestrup et al, 2006, White et al, 2005).

### **3. 2. 2 Inibição da síntese proteica**

As proteínas desempenham um papel importante na vida das bactérias. A síntese proteica é uma fase complexa do processo biológico e começa com a transcrição de DNA em ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) e termina com a tradução do mRNA e a sua translocação. Desses processos, a tradução do mRNA é o alvo mais frequente dos agentes antibacterianos. Neste passo, o ribossoma bacteriano traduz o mRNA em sequências de aminoácidos. A maioria dos antibacterianos inibe a tradução através da ligação a locais específicos no ribossoma, com consequente perda da sua funcionalidade (Aarestrup et al, 2006, White et al, 2005).

### **3. 2. 3 Inibição da Síntese de DNA**

A síntese de ácidos nucleicos é uma função vital para a célula bacteriana, pois permite a replicação do cromossoma bacteriano durante a divisão celular e a síntese de RNA permite a expressão dos genes e a síntese proteica através da transcrição do DNA em RNA. Há três classes de agentes antibacterianos que agem na síntese de ácidos nucleicos; as quinolonas e cumarins, que agem na síntese de DNA e a rifampicinas que agem na

síntese de RNA (Aarestrup et al, 2006, White et al, 2005).

### **3. 2. 4 Outros alvos para acção dos antibacterianos**

A inibição da síntese do ácido fólico é outro alvo da acção de alguns antibacterianos como as sulfonamidas e diaminopiridinas. Estes agem de forma indirecta sobre as vias de síntese de ácido fólico, um precursor importante na síntese dos ácidos nucleicos. As bactérias não são capazes de utilizar ácido fólico exógeno, portanto, têm de produzi-lo para sobreviverem (Aarestrup, 2006).

## 4. QUINOLONAS & MECANISMOS DE RESISTÊNCIA

### 4.1 O Fármaco e a sua Actividade

Em 1962 foi introduzida a primeira quinolona no tratamento de infecções clínicas, o ácido nalidíxico. As quinolonas são compostos de natureza meramente sintética e a sua descoberta foi acidental. Enquanto se faziam experiências com cloroquina em 1958, observou-se que um de seus produtos secundários, a 7-cloroquinolona tinha efeitos bactericidas. A molécula de ácido nalidíxico (Figura nº 2) é um derivado de 7-cloroquinolona com substituição do C8 por N, que dá origem ao núcleo básico das quinolonas, o núcleo naftiridina (Sousa J. C., 2005).

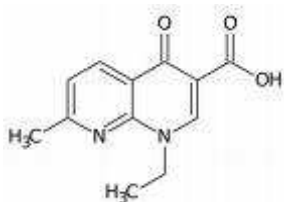
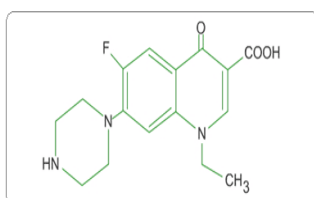


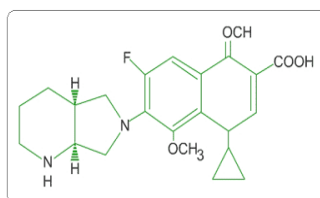
Figura nº 2: Estrutura química do ácido nalidíxico

Em 1980 foram criadas as fluoroquinolonas (Figura nº 3), que revolucionaram o tratamento das infecções onde antes só eram usados antibacterianos parenterais. Estes compostos são absorvidos pelo sistema digestivo de uma forma rápida e eficiente, sem que a alimentação afecte significativamente a sua absorção. Ao contrário, minimiza os efeitos adversos gastrointestinais das quinolonas (Sousa J. C., 2005).

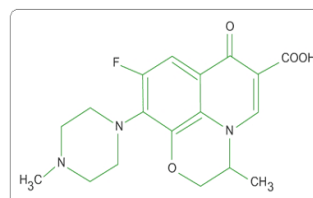
Todas as fluoroquinolonas têm uma estrutura base, sendo fundamental a conservação do ácido carboxílico na posição 3 e a ligação CO na posição 4 do anel de naftiridina para manter suas propriedades bactericidas (Sousa J. C., 2005).



Norfloxacin



Moxifloxacin



Levofloxacin

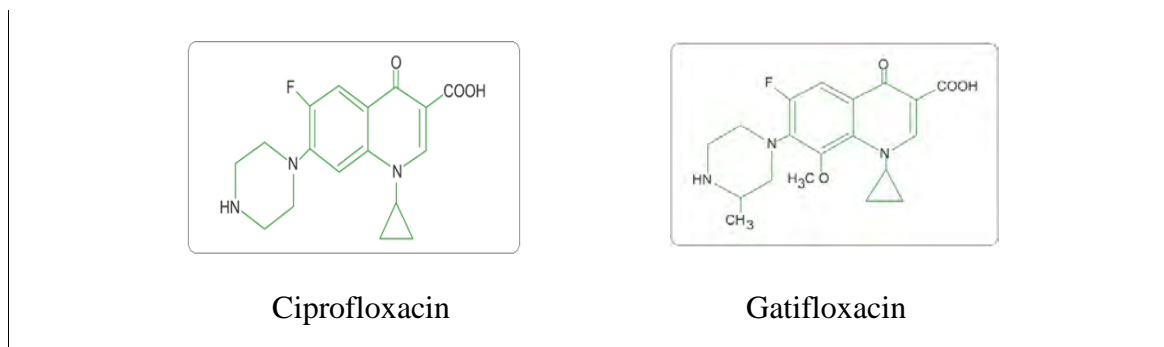


Figura nº 3: Estrutura química de algumas fluoroquinolonas

As quinolonas são classificadas em quatro gerações:

**1ª Geração:** constituída por moléculas com moderada actividade contra bactéria Gram-negativo e com diminuta distribuição sistémica. Usado para tratar infecções urinária não complicadas (Ex. ácido nalidíxico);

**2ª Geração:** constituída por moléculas com boa actividade contra bactérias Gram-negativo, contra patogéneos intracelulares atípicos e com limitada acção contra bactérias Gram-positivo (Ex: norfloxacin, ciprofloxacin, ofloxacin, lomefloxacin);

**3ª Geração:** constituída por moléculas com boa actividade contra bactérias Gram-negativo, bactérias intracelulares atípicas e uma boa acção contra bactérias Gram-positivo (Ex: levofloxacin, gatifloxacin, moxifloxacin e sparfloxacin);

**4ª Geração:** constituída por moléculas com boa actividade contra bactérias Gram-negativo, bactérias atípicas intracelulares, anaeróbios restritos e com muito boa acção contra bactérias Gram-positivo (Ex: trovafloxacin). Para o uso veterinário tem sido usada a quinolona enrofloxacin (Sousa J. C., 2005).

As quinolonas juntamente com os macrólidos, lincosamidas e streptograminas e  $\beta$ -lactâmicos são actualmente os antibacterianos mais comumente prescritos para tratamentos de infecções em humanos (Sousa J. C., 2005).

As quinolonas entram nas células bacterianas através das porinas ou directamente através das membranas lipídicas e citoplasmáticas e alcançam os seus alvos: as topoisomerases II (DNA-girase e topoisomerase IV). O local de ligação primordial é a DNA-girase nas bactérias Gram-negativo e a topoisomerase IV, nas bactérias Gram-positivo (Sousa J. C., 2005).

As topoisomerase II controlam o estado topológico do DNA cromossomal facilitando sua replicação, recombinação e expressão através da quebra e ligação das cadeias de DNA. A DNA-girase é responsável pelo super-enrolamento negativo e por



aliviar essa tensão topológica proveniente da translocação de complexos de transcrição e replicação ao longo do DNA. A topoisomerase IV está envolvida no relaxamento e separação da cadeia dupla de DNA. A actividade destas duas enzimas tem uma importância fundamental no processo de replicação do DNA cromossómico (Sousa J. C., 2005).

As quinolonas agem inibindo a acção das topoisomerase II. Ligam-se ao complexo topoisomerase II/DNA. A formação deste complexo é responsável pela inibição da replicação do DNA e pelo efeito bacteriostático das quinolonas. A sua acção bactericida é um evento separado da formação deste complexo e surge como consequência da religação das pontas de DNA livres do complexo quinolona/topoisomerase II/DNA. O bloqueio da acção bactericida das quinolonas causado por acção de alguns inibidores de síntese proteica implica no envolvimento de factores proteicos que ainda permanecem desconhecidos (Nordmann P.&Poirel L., 2005).

Drlica K., et al, (2008), propõem que a fragmentação cromossómica é uma forte alternativa do efeito de morte rápida das bactérias quando sob efeito das quinolonas. De acordo com esta hipótese, descrevem o efeito letal desta classe de antibacterianos num processo de dois passos. No primeiro passo há formação reversível de complexos clivados (efeito bacteriostático). Este passo bloqueia a replicação do DNA, induz a resposta SOS e leva à filamentação da célula. Já no segundo passo, que é letal e requer altas concentrações do antibacteriano, o DNA é quebrado e libertado da sua localização no cromossoma, por pelo menos dois processos: um requer a síntese proteica e o outro não. O processo envolvido na morte celular bacteriana depende da estrutura das quinolonas. As mais velhas requerem síntese proteica, enquanto algumas das mais novas, funcionam sem que haja síntese proteica (Drlica K., et al, 2008).

#### **4. 2 Mecanismos de Resistência às Quinolonas**

A aquisição de resistência às quinolonas é principalmente através de mutações cromossomais, embora tenham sido descritos recentemente, mecanismos de resistência mediados por plasmídeos (PMQR) como as proteínas Qnr, aminoglicosido acetiltransferase AAC(6')-IB-cr e QepA (bomba de efluxo para fluoroquinolonas hidrofílicas). As mutações cromossomais podem ser divididas em dois grupos: mutações nos genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE* que codificam, respectivamente a DNA-girase e Topoisomerase IV (locais de

ligação das quinolonas) e mutações conferindo redução da concentração do fármaco na bactéria tanto por efluxo activo do fármaco como por absorção diminuída do fármaco (White et al, 2005, Poirel L. et al 2007).

**Mutações no local de ligação:** mutações relacionadas com a resistência às quinolonas foram localizadas numa região da *gyrA*, conhecida como a região determinante da resistência às quinolonas (QRDG). Esta região compreende desde Ala-67 até Gln-106 e está situada perto de Tyr-122, onde a DNA-girase se liga ao DNA. As mutações mais frequentes encontradas em isolados clínicos foram: Ser-83 e Asp-87 estão relacionadas com moderado nível de resistência às quinolonas. Mutações no gene *parC* também foram encontradas, estas mutações envolvem substituições de aminoácidos de Ser-80 por Arg ou Ile e Glu-84 por Val ou Lis. Mutações em *parE* e *gyrB* não são importantes na aquisição de resistência em isolados clínicos de *E. coli*. Uma mutação sozinha normalmente gera baixo nível de resistência, no entanto, várias mutações associadas são capazes de dar origem aos altos níveis de resistência. Há excepções em que microrganismos não têm a topoisomerase IV, nestes casos, uma única mutação em *gyrA* pode causar alto nível de resistência (White et al, 2005).

**Absorção diminuída:** a diminuição da absorção das quinolonas pelas bactérias está associada, basicamente, com a redução ou total perda da expressão das porinas OmpF. Uma vez que a principal via de entrada das quinolonas no interior da célula bacteriana é via OmpF (White et al, 2005).

**Efluxo activo:** sistemas de efluxo de múltiplas drogas têm sido identificados em várias espécies de bactérias Gram-positivo e Gram-negativo, como causa de resistência antibacteriana, incluindo as quinolonas. Como a expressão das bombas de efluxo é baixa em condições normais, a sobreexpressão é uma condição fundamental para ocorrer resistência através deste mecanismo. Em isolados clínicos de *E. coli*, AcrAB-TolC é a bomba de efluxo melhor caracterizada. AcrAB é uma proteína da membrana interna e funciona em conjunto com uma proteína de membrana externa, a TolC. O controlo de produção do sistema de efluxo AcrAB-TolC está sob acção vários genes reguladores, em especial, o sistema regulador global *marRAB* e *soxRS*, mas também *acrR*. Mutações nestes

sistemas reguladores levam a sobreexpressão do sistema de efluxo AcrAB-TolC e, consequentemente, à resistência às quinolonas. Em oposição, a expressão reduzida ou perda deste sistema de efluxo, pode reduzir o CMI das quinolonas abaixo do *breakpoint* (White et al, 2005).

Muito recentemente foi descrita em dois isolados clínicos de *E. coli* do Japão e da Bélgica, uma bomba de efluxo cujo gene (*qepA*) tem como vector um plasmídeo que codifica a proteína QepA. Esta proteína confere resistência às fluoroquinolonas hidrofílicas como a ciprofloxacina, norfloxacina e enrofloxacin com um aumento da CMI de 32 a 64 vezes (Poirel L. et al, 2008).

**Protecção da DNA-girase e topoisomerase IV** (loais de ligação das quinolonas): Na década de 90 foi descrito pela primeira vez, um mecanismo que confere resistência de baixo nível através da protecção dos sítios de ligação das quinolonas. O gene responsável por este fenótipo foi identificado e denominado *qnr* (*quinolone resistance*) e codifica uma proteína denominada Qnr que pertence à família de proteína com pentapéptidos repetidos. O gene *qnrA1* faz parte do complexo In4 de integrões classe 1, encontrados em plasmídeos provenientes inicialmente de *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* (Robicsek A. et al, 2006<sup>a</sup>).

Trata-se na realidade de um mecanismo que é capaz de aumentar a CMI das quinolonas, não sendo suficientemente forte para causar resistência isoladamente. Provavelmente age de forma aditiva a outros mecanismos de resistência aos mesmos fármacos (Robicsek A. et al, 2006<sup>a</sup>).

**Inactivação enzimática:** até o presente, não têm sido descritos mecanismos de resistência muito potentes causados por inactivação enzimática, como é o caso das  $\beta$ -lactamases. No entanto, foi descoberto em *E. coli* contendo o gene *qnrA*, o gene *aac(6')-Ib-cr* que codifica uma aminoglicosido acetiltransferase responsável pela resistência à kanamicina, amicacina e tobramicina. Trata-se de uma variante de AAC(6')-Ib e quando encontrada em *E. coli*, possui duas substituições no códon 102 (Trp→Arg) e 179 (Asp→Tyr) . Esta enzima modificada acetila a ciprofloxacina e norfloxacina, conferindo CMIs levemente aumentadas (duas a quatro vezes). A expressão de AAC(6')-Ib-cr facilita a sobrevivência de microrganismos com mutações em DNA-girase e topoisomerase IV, através do aumento

da concentração preventiva de mutações de 0,2 a 3,2mg/ml. De acordo com o pequeno número de estudos desenvolvidos em *Enterobacteriaceae* até o momento, esta enzima está mais disseminada do que as Qnr. Está frequentemente associado ao crescente problema das ESBLs como a CTX-M-15, entre isolados de enterobactérias adquiridas na comunidade (Poirel L. et al, 2008).

## 5. OS GENES *qnr* e as PROTEÍNAS Qnr

No final da década de 90 foi confirmada a existência de um mecanismo de resistência às quinolonas mediado por plasmídeos (PMQR), por Luiz Martinez e seus colegas. Num estudo feito para avaliar a habilidade do plasmídeo pMG252 em aumentar os níveis de resistência a vários agentes antibacterianos, foi encontrado um aumento significativo da CMI das quinolonas numa estirpe de *Klebsiella pneumoniae* com as porinas deficientes, quando na sua presença. No entanto, observaram que mesmo numa estirpe de *E. coli* com as porinas intactas, o plasmídeo pMG252 conferia aumento da CMI das quinolonas de 8 a 64 vezes (Robicsek A. et al, 2006<sup>a</sup>).

Em consequência da clonagem desse gene, foi encontrada uma *Open Reading Frame* (ORF), de 657bp que codificava uma proteína que foi designada Qnr, responsável pelo aumento da CMI das quinolonas. Mais recentemente, esta proteína foi renomeada QnrA1, sendo que foram descobertas outras proteínas com grande similaridade à mesma (Robicsek A. et al, 2006<sup>a</sup>).

As proteínas Qnr pertencem à família de proteínas em cuja há repetição de pentapéptidos (Ser, Thr, Ala ou Val), (Asp ou Asn) (Leu ou Phe) (Ser, Thr ou Arg), (Gly), sempre na mesma sequência. Há mais de 500 proteínas desta família que são conhecidas, no entanto, a função da maioria delas permanece desconhecida (Robicsek A. et al, 2006<sup>a</sup>).

### 5. 1 Genes *qnr* Identificados até ao Momento

Até recentemente, acreditava-se que a sequência dos genes *qnrA* era altamente conservada. Os genes *qnrA* descobertos inicialmente em EUA, em Europa e em China apresentavam sequências que variavam num único polimorfismo (CTA-CTG na posição 537). Posteriormente, foi encontrado em China uma variante de *qnrA* em um isolado clínico de *Klebsiella oxytoca*, que diferenciava em quatro códons do gene originalmente encontrado. Esta variante foi designada *qnrA2* e a primeira renomeada *qnrA1* (Robicsek A. et al, 2006<sup>a</sup>).

Em França foi realizado um trabalho de pesquisa com o objectivo de encontrar a possível origem dos *qnrA* no cromossoma de microrganismos Gram-negativo do ambiente,

de animais e de humanos, levando em conta o conhecimento da transferência horizontal de genes. Encontraram três novas variantes de *qnrA* (*qnrA3*, *qnrA4* e *qnrA5*) no cromossoma de *Shewanella algae*. Estes novos genes variavam de dois a quatro codões de *qnrA1*. Subsequentemente, encontraram outra variante que designaram *qnrA6* (Poirel L. et al 2005).

Em 2003 no Japão, durante um surto de intoxicação alimentar causada por um único clone de *Shigella Flexineri* 2b, foi descoberta uma única estirpe resistente a ciprofloxacina. Desvendou-se ainda que a mesma carregava um plasmídeo conjugativo que conferia níveis de resistência diferentes de *qnrA*. Através de clonagem, descobriram uma ORF de que codificava uma proteína de 218 aminoácidos pertencente à família de proteínas em cujas há repetição de petapéptidos. Esta proteína apresentava 59% de similaridade com de aminoácidos com QnrA e foi nomeada QnrS. Já foi encontrado nos EUA uma variante de QnrS com 91% de similaridade com a primeira descoberta. Foram designadas QnrS2 e a anterior, renomeada QnrS1 (Robicsek A. et al, 2006<sup>a</sup>).

Num estudo realizado em estirpes de *Klebsiella pneumoniae* provenientes da Índia, para entender as bases da expressão das ESBLs, foi observado que os plasmídeos que codificavam as ESBLs também conferiam aumento da CMI das quinolonas. Foram pesquisados os genes *qnr* já conhecidos, no entanto, somente duas estirpes continham genes já descritos. Em consequência da pesquisa responsável por este fenómeno, foi encontrado o gene *qnrB1*. A proteína QnrB1 tem 39,5% e 37,4% de similaridade de aminoácidos com QnrA e QnrS, respectivamente. QnrB pertence a mesma família de proteínas que as demais Qnr. Neste mesmo estudo foi encontrado mais uma variante de QnrB, designado QnrB2 (Jacoby G. A. et al, 2006).

Até o momento, foram identificados e depositados no *GeneBank* 19 variantes do *qnrB*, 3 variantes de *qnrS* e 6 variantes de *qnrA*, em diferentes partes do mundo e em diferentes espécies de bactérias constituindo-se na sua grande maioria em *Enterobacteriaceae* (Jacoby G. et al, 2008).

## **5. 2 Origem dos Genes *qnr***

A grande variedade de *qnr* descoberta recentemente e sua difusão nas *Enterobacteriaceae* em todo o mundo, sugere fortemente que a sua existência precedeu em muito o nosso conhecimento acerca deles. Vários estudos foram realizados nos últimos

anos com a finalidade de descobrir a sua origem e a sua função desempenhada antes da inserção no contexto clínico (Robicsek A. et al, 2006<sup>a</sup>).

Prevendo que os genes *qnr* tiveram origem no cromossoma de um organismo ocupando um reservatório humano, animal ou ambiental, Poirel e a sua equipa desenvolveram uma pesquisa que envolveu sequências do genoma de 48 espécies de bactérias Gram-negativo de vários géneros à procura de QnrA. Foram encontradas quatro variantes de *qnrA* (*qnrA2* a *qnrA5*) em três estirpes de *Shewanella algae*. Estes microrganismos apresentavam CMI das quinolonas 4 a 8 vezes maiores quando comparadas com *Shewanella putrefaciens*, um microrganismo muito próximo de *S. algae* e que não continha em seu cromossoma o *qnrA*. O mais importante é que estas variantes de *qnrA* apresentavam-se insertas no DNA cromossomal. Estes dados sugerem que *S. algae* é o reservatório dos genes *qnrA*. *Shewanella algae* pertence à família *Shewanellaceae* que está largamente distribuída na água salgada, bem como nas fontes de água fresca (Poirel L. et al, 2005).

Recentemente foi descoberto, em uma estirpe de *Vibrio splendidus* 12B01, uma OFR que codifica uma proteína de 218 aminoácidos com 84 e 88% de similaridade de aminoácidos com QnrS1 e QnrS2, respectivamente. Quando clonados em *E. coli*, estes genes apresentavam um fenótipo muito parecido com os genes *qnrS1* e *qnrS2*, aumentado em 8 vezes a CMI de ácido nalidíxico e 4 a 16 vezes a CMI das fluoroquinolonas. Estes resultados sugerem que a origem dos genes *qnrS* provavelmente está num microrganismo geneticamente relacionado com *V. splendidus* (Cattoir V. et al, 2007<sup>b</sup>).

Estudos subsequentes demonstraram que proteínas da mesma família das Qnr, com similaridade de 40 a 67% de aminoácidos com as Qnr estavam presentes noutros organismos presentes nas águas, como *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Photobacterium profundum*. Plasmídeos recombinantes que expressam estas proteínas aumentavam a CMI de ciprofloxacina em *E. coli* transformantes de 0.003µg/ml para mais de 0,25µg/ml (Poirel L. et al, 2005).

Todos estes dados sugerem que os genes *qnr* presentes nas *Enterobacteriaceae* podem ter origem no DNA cromossomal de microrganismos presentes na água ou outros ambientes. Face a intensa pressão causado pela presença das quinolonas, tais genes podem ter entrado em circulação através de elementos genéticos móveis (Poirel L. et al, 2005).

### 5.3 Epidemiologia dos Genes *qnr*

Após a descoberta do gene *qnrA* num isolado de *Klebsiella pneumoniae* em EUA em 1994, foram feitos esforços em várias partes do mundo para determinar a prevalência deste gene. Num estudo realizado com 350 isolados de microrganismos Gram-negativo isolados na sua maioria na década de 90, tentando incluir uma ampla área geográfica e uma variedade de gêneros, foram encontrados somente seis isolados com *qnrA* (quatro de *E. coli* e duas de *Klebsiella spp*). Todos estes seis isolados foram recolhidos entre Julho e Dezembro de 2004, no mesmo centro, em Alabama, onde o *qnrA* foi encontrado originalmente. Todos estes isolados transferiam, juntamente com a resistência ao ácido nalidíxico, um gene que codifica a  $\beta$ -lactamase FOX-5. Ambos os genes estavam presentes no mesmo plasmídeo pMG252. Curiosamente, isolados contendo a  $\beta$ -lactamase FOX-5 estavam presentes em estudos realizados com isolados provenientes do mesmo centro, recolhidos entre 1995 e 2001, enquanto o gene *qnrA* não foi encontrado (Jacoby et al, 2003).

Desde este estudo inicial, numerosos estudos pesquisando os genes *qnr* têm sido desenvolvidos (Tabela nº. 2). A maioria deles utilizou técnicas de PCR e de hibridação e envolveram a família das *Enterobacteriaceae*.

Mais recentemente, o gene *qnrS2* tem sido encontrado em bactérias Gram-negativo da água, mais especificamente em *Aeromonas spp* (Cattoir et al, 2008). Em bactérias Gram-positivo clinicamente importantes, foi identificada uma proteína muito parecida com as Qnr e também confere aumento da CMI das quinolonas (Rodriguez-Martinez et al, 2008).

Embora estes genes pareçam ser pouco comuns em populações de bactérias Gram-negativo em geral, a prevalência em alguns microrganismos produtores de ESBLs tem excedido os 40%. Nestes estudos, os genes *qnr* têm sido encontrados em todos os continente habitados pelo homem e na maioria das *Enterobacteriaceae* comuns na clínica. Estas espécies incluem *E. coli* e *Klebsiella spp* (*K. Pneumoniae* e *Klebsiella oxytoca*), *Enterobacter spp* (*Enterobacter cloacae*, *Enterobacter amnigenus* e *Enterobacter sakazakii*), *Citrobacter freundii* e *Citrobacter koseri*, *Providencia stuartii* e *Salmonella spp*. Notavelmente ausente desta lista está o *Proteus spp* e outras bactérias Gram-negativo clinicamente importantes como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter spp*. Todos os



três já foram incluídos em estudos de pesquisa de *qnr*, porém tratavam-se de estudos pequenos. Desse modo, não está claro se a sua ausência se deve ao facto de realmente estarem ausentes nestes microrganismos ou se está relacionado com o pequeno número de isolados testados (Robicsek A. et al, 2006<sup>a</sup>).

Referência	Alvo de Pesquisa	Ano de colecta	Área geográfica	Tipo de bactéria	Achados
Martinez et al	...	1994	Alabama, EUA	<i>K pneumoniae</i>	Primeira identificação de <i>qnrA</i>
Jacoby et al	<i>qnrA</i>	1990s	19 países, três continentes	Inicialmente em <i>K pneumoniae</i> e <i>E. coli</i> , mas participaram no estudo, muitos outros géneros	Seis isolados de <i>K pneumoniae</i> e <i>E. coli</i> foram positivos, todos de Alabama e de 1994.
Rodriguez-Martinez et al	<i>qnrA</i>	1990s	EUA, Espanha e outros países*	<i>E. coli</i> (266) e <i>K. pneumoniae</i> (159)	Nenhuma das <i>E. coli</i> mas três (2%) de <i>K. pneumoniae</i> foram positivos (recolhidos entre 1995-1997). Dois destes eram sensíveis às fluoroquinolonas.
Poirel et al	<i>qnrA</i>	1999	Bangkok, Tailândia	23 <i>Enterobacteriaceae</i> carregando o gene da $\beta$ -lactamase bla <sub>VEB1</sub>	11(48%) isolados foram positivos
Wang et al	<i>qnrA</i>	2000-2001	Shangai, China	<i>E. coli</i> (78), todas resistentes à ciprofloxacina	Seis(8%) foram positivos e (todos do mesmo hospital). Vários plasmídeos envolvidos.
Wang et al	<i>qnrA</i>	1999–2002	vários estados de EUA	72 <i>K.pneumoniae</i> e 38 <i>E. coli</i> , todos com CMI de cipro. $\geq 2 \mu\text{g/mL}$ e CMI de ceftazidima $\geq 16 \mu\text{g/mL}$	Nenhuma das <i>E. coli</i> e oito (11%) de <i>K. pneumoniae</i> foram positivos.
Mammeri et al., Nordmann & Poirel	<i>qnrA</i>	2003	Paris, França	449 <i>Enterobacteriaceae</i> resistentes ao ácido nalidíxico	Dois (0,5%) foram positivos, uma <i>E. coli</i> e uma <i>Enterobacter cloacae</i>
Jonas et al	<i>qnrA</i>	2000-2003	Vários locais de Alemanha	136 <i>Enterobacteriaceae</i> , isolados de 34 UTIs da Alemanha	Um <i>Enterobacter spp</i> e uma estirpe de <i>Citrobacter freundii</i> que causou uma epidemia, foram positivos
Paauw et al	<i>qnrA</i>	2001-2003	Utrecht, Países Baixos	83 estirpes epidémicas de <i>Enterobacter cloacae</i>	78 (94%) das estirpes tinham <i>qnrA</i> . adicionalmente 31% das bactérias Gram-negativo que colonizavam os pacientes colonizados com bactérias <i>qnrA</i> positivas também possuíam <i>qnrA</i>
Wiegand et al	<i>qnrA</i>	2001	Cairo, Egito	30 <i>Enterobacteriaceae</i> com CMI de ciprofloxacina $\geq 0.25 \mu\text{g/mL}$	Três estirpes não relacionadas de <i>Providencia stuartii</i> tinham <i>qnrA</i>
Nazic et al	<i>qnrA</i>	2002-2004	Istambul, Turquia	49 <i>Enterobacteriaceae</i> produtoras de ESBLs	Dois (4%) foram positivos.
Joeng et al	<i>qnrA</i>	2001-2003	Seoul, Korea	<i>E. coli</i> (260), <i>E. cloacae</i> (206)	Dois (0,7%) <i>E. coli</i> e 11 (5%) de <i>E. cloacae</i> foram positivas
Corkill et al	<i>qnrA</i>	2003-2005	Liverpool, UK	47 <i>Enterobacteriaceae</i> de culturas de sangue, resistentes à cipro. E cefotaxime.	15 (32%) tinham <i>qnrA</i> . 12 eram clonalmente distintos. Diferentes plasmídeos estavam envolvidos
Cheung et al	<i>qnrA</i>	2003	Hong Kong, China	Estirpes epidémicas de <i>Salmonella</i> entérica serotipo <i>Enteritidis</i>	Todas as quatro estirpes tinham <i>qnrA</i> , porém em 4 plasmídeos diferentes.
Gay et al	<i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> e <i>qnrS</i>	1996-2003	vários locais dos EUA	335 isolados de <i>Salmonella</i> não-thiophi. 233 com CMI de cipro. $\geq 0,06 \mu\text{g/mL}$ , 102 com CMI $\geq 0,03 \mu\text{g/mL}$ .	Dez tinham <i>qnrB</i> ou <i>qnrS</i> , Todos eles tinham CMI de cipro. $\geq 0,06 \mu\text{g/mL}$ . Nenhum continha <i>qnrA</i> .
Poirel et al	<i>qnrA</i>	2004	Sydney, Austrália	23 <i>Enterobacteriaceae</i> produtoras de ESBLs ou ciprofloxacina <sup>R</sup>	Dois (10%) tinham <i>qnrA</i> .
Poirel et al	<i>qnrA</i> , <i>qnrS</i>	2000-2005	Calgary, Canadá	139 <i>Enterobacteriaceae</i> resistentes à cipro e ESBL-negativos. 101 ESBLs +	2 (2%) dos produtores de ESBLs tinham <i>qnrA</i> .
Cano et al	<i>qnrA</i> e <i>qnrS</i>	2004-2005	Santander, Espanha	100 <i>Enterobacteriaceae</i> ác. nalidíxico <sup>R</sup> , 100 <i>E. coli</i> multirresistentes e 173 <i>Enterobacteriaceae</i> ESBL +	Dois isolados produtores de ESBLs ( <i>C. Freundii</i> e <i>E. cloacae</i> ) de um único paciente tinham <i>qnrA</i>
Robicsek <sup>b</sup> et al	<i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> e <i>qnrS</i>	1999-2004	vários locais de EUA	313 isolados de <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> e <i>Enterobacter spp</i> , todos com CMI à cipro. $\geq 0,25 \mu\text{g/mL}$	<i>qnrA</i> ou <i>qnrB</i> estava presente em dois(4%) de todas as 47 <i>E. coli</i> , 21 20%) das 106 <i>K. Pneumoniae</i> e 50(31%) .

Cano et al	<i>qnrA</i> e <i>qnrS</i>	2004-2005	Norte e sul da Espanha	202 <i>Enterobacter spp</i>	Nenhuma tinha <i>qnrA</i> , 22(11%) possuíam <i>qnrS</i> .
Jacoby et al	<i>qnrA</i> , <i>qnrB1</i> e <i>qnrB2</i>	2002-2003	Coimbatore, Índia Sul da Índia	5 isolados de <i>K. pneumoniae</i> produtoras de ESBLs 100 <i>Enterobacteriaceae</i>	2 isolados continham <i>qnrA</i> . 3 isolados tinham <i>qnrB1</i> . Quatro plasmídeos distintos provenientes de <i>E. coli</i> , <i>E. cloacae</i> e <i>Citrobacter koseri</i> tinham <i>qnrB2</i> , porém todos os plasmídeos codificavam SHV-12
Lavigne et al	<i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> e <i>qnrS</i>	2004	Sul e centro de França	112 isolados de <i>E. coli</i> produtoras de ESBLs	5(7,7%) das estirpes que produziam CTX-M, tinham <i>qnrA</i> . Estirpes diferentes, porém no mesmo integrão tipo-sul1.
Castanheira et al	<i>qnrA</i>	2002-2003	Brasil	144 <i>E. coli</i> resistentes à cipro.	Somente um isolado(0,68%) tinha <i>qnrA1</i> .
Cattoir et al	<i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> e <i>qnrS</i>	2002-2004	Kuwait	64 isolados de <i>Enterobacteriaceae</i> produtoras de ESBLs	3(4,7%) tinham genes tipo <i>qnrB</i> . <i>qnrB2</i> foi encontrado em <i>E. cloacae</i> , <i>qnrB7</i> e <i>qnrB8</i> em <i>E. cloacae</i> e <i>C. Freundii</i> , respectivamente.
Strahilevitz et al	<i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> e <i>qnrS</i>	1990-2005	Jerusalem	579 isolados de <i>Enterobacter spp</i> , 679 de <i>K. pneumoniae</i>	De <i>Enterobacter spp</i> recolhidos a partir de 1994, 33(6,8%) tinham <i>qnr</i> (8 <i>qnrA</i> , 19 <i>qnrB</i> e 6 <i>qnrS</i> ). De <i>K. pneumoniae</i> , 10(1,5%) tinham <i>qnr</i> ; 3 <i>qnrA</i> (1996-98), 6 <i>qnrB</i> (e um <i>qnrS</i> (2003-05).
Oktem et al	<i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> e <i>qnrS</i>	2004	Várias regiões de Turquia	34 isolados de <i>E. coli</i> e 44 de <i>K. pneumoniae</i> , todos produtores de ESBLs e isolados de sangue.	Cinco (6,4%) dos isolados resistentes às quinolonas tinham <i>qnrA</i> . <i>qnrB</i> e <i>qnrS</i> não foram detectados.
Jiang et al	<i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> e <i>qnrS</i>	1998-2002	Várias províncias de China	363 isolados de <i>E. coli</i> e <i>K. pneumoniae</i> produtoras de ESBLs.	30 (8%) tinham <i>qnr</i> isoladamente ou em combinação (13 <i>qnrA</i> , 8 <i>qnrB</i> e 9 <i>qnrS</i> )
Cattoir et al (2008)	<i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> e <i>qnrS</i>	2006	Paris, França	Bactérias Gram-negativo de amostras de água do Rio Seine em 6 locais diferentes.	Duas de seis amostras continham <i>qnrS2</i> . Identificado <i>Aeromonas spp.</i> possuidor do gene.
Iabadene et al	<i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> e <i>qnrS</i>	2003-2007	Algéria	141 isolados de <i>E. cloacae</i>	5(3,5%) tinham <i>qnr</i> , todas eram produtoras de ESBLs (3 <i>qnrS1</i> , 1 <i>qnrB1</i> e um <i>qnrB4</i> e <i>qnrS1</i> simultaneamente.
Minarini et al	<i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> e <i>qnrS</i>	2000-2005	sudeste do Brasil	257 <i>Enterobacteriaceae</i> resistentes ao ácido nalidixico	3(1,2%) de <i>E. coli</i> e dois <i>K. pneumoniae</i> (0,8%) tinham <i>qnrB2</i> e um (0,4%) <i>Citrobacter freundii</i> possuía <i>qnrB8</i> .
Lavilla et al	<i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> e <i>qnrS</i>	2003-2004	Barcelona, Espanha	305 <i>Enterobacteriaceae</i> produtoras de ESBLs.	15(4,9%) isolados diferentes entre si, tinham <i>qnr</i> , 14 <i>qnrA</i> (6 <i>K. pneumoniae</i> , 6 <i>E. cloacae</i> e 2 <i>E. coli</i> ) e 1 <i>K. pneumoniae</i> possuía <i>qnrS1</i> .
Wu et al	<i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> e <i>qnrS</i>	2004	Taiwan, China	526 isolados de <i>E. cloacae</i>	86 (16,3%) tinham <i>qnr</i> isoladamente ou em co-expressão (3 <i>qnrA1</i> , 53 <i>qnrB2</i> e 34 <i>qnrS1</i> )
Picão et al	<i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> e <i>qnrS</i>	2005-2006	Suíça	microrganismos da água	um isolado de <i>Aeromonas allosaccharophila</i> tinha um <i>qnrS2</i> em um plasmídeo.
Shim et al	<i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> e <i>qnrS</i>		Korea	143 <i>E. coli</i> e 59 <i>K. pneumoniae</i> resistentes à ciprofloxacina	De <i>E. coli</i> , 8(5,6%) tinham <i>qnrB4</i> . Das <i>K. pneumoniae</i> 33(55,9%) tinham <i>qnrB</i> (29 <i>qnrB4</i> , 3 <i>qnrB2</i> e 1 <i>qnrB6</i> ).
Yue et al	<i>qnrA</i> , <i>qnrB-S</i>	2005-2006	Vários locais de China	232 <i>E. coli</i> isoladas de suínos e aves	14(6%) dos isolados tinham <i>qnr</i> (1 <i>qnrB</i> e 13 <i>qnrS</i> ).
Wang et al	<i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> e <i>qnrS</i>	2006	Chungnam, Korea	213 <i>E. coli</i> e <i>K. pneumoniae</i> resistentes à cipro. e provenientes de crianças.	19(8,9%) tinham <i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> e <i>qnrS</i> isoladamente ou em co-expressão (11 <i>E. coli</i> e 8 <i>K. pneumoniae</i> ).

Hopkins et al	<i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> e <i>qnrS</i>	2002-2005	Paris, França	118 <i>Salmonella enterica</i> e 103 <i>E. coli</i>	6 <i>S. Enterica</i> de diferentes serotipos tinham <i>qnrS1</i> em plasmídeos diferentes.
Schultz et al	<i>qnrA</i> <i>qnrS</i>	2004	Ho Chi Minh city, Vietnam	28 <i>K. pneumoniae</i> resistentes à gentamicina. 32 <i>E. coli</i> e <i>Citrobacter spp.</i> produtoras de ESBLs.	24 (86%) de <i>K. pneumoniae</i> tinham <i>qnrS</i> ou <i>qnrA</i> . 8 (25%) dos 32 isolados produtores de ESBLs possuíam <i>qnrA</i> ou <i>qnrS</i>

**Tabela nº. 2:** Epidemiologia dos genes *qnr*. Adaptada e completada a partir de Robicsek A. et al, (2006<sup>a</sup>).

## 5. 4 Mecanismo de Acção das Proteínas Qnr

Até o momento, de todas as proteínas da família das Qnr, a melhor caracterizada é QnrA. A proteína QnrA liga-se com grande especificidade à DNA-girase e à topoisomerase IV, nas duas subunidades de cada enzima. Essa ligação parece ser directa e independente da presença de DNA, ciprofloxacina e ATP. Portanto, a ligação ocorre provavelmente antes da formação do complexo letal TopoisomeraseII/DNA/quinolona. Ainda está por ser elucidada a exacta actuação das Qnr na protecção das topoisomerasas II às quinolonas: se a sua ligação bloqueia o acesso das quinolonas à enzima, se reduz o número de locais de ligação ou se tem outros efeitos sobre as topoisomerasas II (Tran J. H. et al 2005<sup>a,b</sup>). O que se sabe ao certo é que elas não inibem significativamente a acção das topoisomerasas II no processo de replicação do DNA, numa vasta gama de concentrações. Uma concentração de 25µM de QnrB+his6 inibe a actividade da DNA-girase enquanto a 5µM (750x mais que a DNA-girase) não afectam a sua actividade. A protecção de QnrB aparece como sendo mais forte que QnrA em ensaios *in vitro*. A protecção da DNA-girase pela proteína QnrA é proporcional à concentração de QnrA e inversamente proporcional à concentração de ciprofloxacina (Tran J. H. et al, 2005<sup>a</sup>).

Além das Qnr, duas outras proteínas da família dos pentapéptidos repetidos, têm particular interesse na compreensão do mecanismo de acção antibacteriana conferido pelas Qnr, a McbG e a MtMfpA (Figura nº 3).

O péptido microcin-B17, que ocorre naturalmente, é tóxico para as bactérias e tem um mecanismo de acção muito parecido ao das quinolonas; inibe a DNA-girase. Organismos que produzem microcin-B17 também produzem McbG, uma proteína com pentapéptidos repetidos, com 19,6% de similaridade de aminoácidos com QnrA e que protege a DNA-girase dos efeitos do microcin B17 e também de algumas quinolonas. A proteína MfpA tem 18,9% de similaridade de aminoácidos com QnrA, foi identificada no

cromossoma de *Mycobacterium smegmatis*. Quando expresso em plasmídeo, o gene *mfpA* resulta num aumento da CMI da ciprofloxacina nestes microrganismos e a sua inactivação, aumenta a susceptibilidade à ciprofloxacina. Subsequentemente, uma variante desse gene foi encontrada em *Mycobacterium tuberculosis*, agindo como um inibidor da actividade da DNA-girase através da interacção directa com esta enzima. Tanto a sua estrutura tridimensional como a distribuição da sua carga, são muito semelhantes com as do DNA. Portanto, acredita-se que esta proteína inibe a DNA-girase através da competição com o próprio DNA na ligação com a DNA-girase. Também foi proposto que esta interacção represente o fundamento da resistência às quinolonas que este gene confere (Robicsek A. et al, 2006<sup>a</sup>).

Considerando a existência natural de uma série de inibidores das topoisomerases II e o facto dos genes *qnr* terem sido encontrados em vários continentes, especula-se a probabilidade desses genes desempenharem um papel fisiológico nas células bacterianas. Uma das funções destes genes pode ser provavelmente, a protecção das topoisomerases II contra a acção de inibidores que ocorrem naturalmente, como a “microcinB17, CcdB e ParE (Robicsek<sup>a</sup> A. et al, 2006).

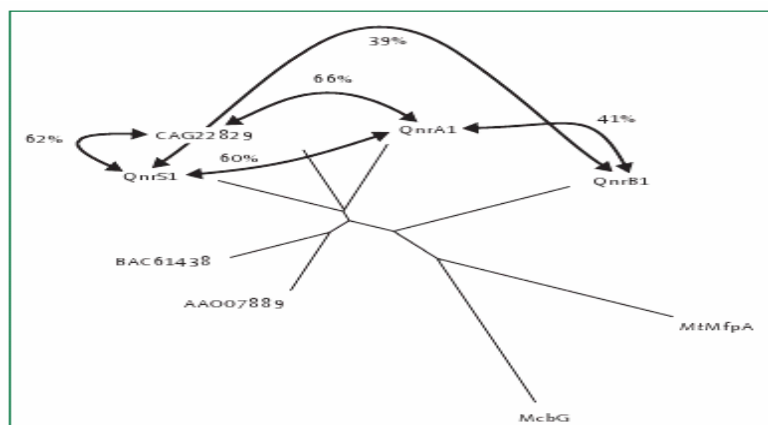


Figura nº 3: Relação de aminoácidos das proteínas conhecidas que afectam a DNA-girase, pertencentes à família de proteínas em que há repetição de pentapéptidos. As proteínas QnrA e QnrS parecem compartilhar um ancestral mais semelhante com CAG22829, uma proteína cromossomal proveniente de *Photobacterium profundum*, um microrganismo do ambiente aquático; do que com QnrB. BAC61438 é encontrado em *Vibrio parahaemolyticus*, AA007889 é encontrado em *Vibrio vulnificus*, MtbMfpA é encontrado em *Mycobacterium tuberculosis*, e McbG é encontrado em *Enterobacteriaceae*. Proteínas QnrA codificadas cromossomalmente provenientes de *Shewanella spp.* são relacionados em mais de 98%. <http://align.genome.jp/>

## 5. 5 Avaliação da Actividade de Resistência das proteínas Qnr

Para avaliar a dimensão da protecção que as proteínas Qnr conferem às *Enterobacteriaceae* contra as quinolonas, usualmente é utilizado a medição das diferenças da CMI destes antibacterianos numa estirpe de *E. coli* com e sem a presença de um plasmídeo que contém o gene *qnr* em questão. Em alguns casos, a bactéria dadora do plasmídeo com o gene *qnr* apresentava níveis de resistência mais elevados às quinolonas quando comparada ao seus transconjugantes, sugerindo a co-existência de outros mecanismos de resistência ao mesmo antibacteriano, mas que provavelmente são cromossomais. Outra forma de avaliar os efeitos de um gene que confere resistência antibacteriana é a verificar a mudança na concentração preventiva de mutação (MPC). MPC é a menor concentração de um fármaco requerido para prevenir o crescimento de mutantes resistentes a este fármaco, partindo de um inóculo de  $10^{10}$  CFU. Enquanto a concentração se mantém acima da MPC, mutantes resistentes não podem sobreviver (Robicsek A. et al, 2006<sup>a</sup>).

A descoberta que QnrA facilita a sobrevivência de mutantes com maiores níveis de resistência às fluoroquinolonas, incitou a avaliação de seus efeitos na MPC da ciprofloxacina. A MPC da ciprofloxacina para uma estirpe selvagem de *E. coli* J53 é 0,125 µg/ml e *E. coli* contendo um plasmídeo com *qnrA* tem uma MPC dez vezes maior. Desse modo, como em mutações cromossomais de resistência às fluoroquinolonas, este mecanismo que confere baixo nível de resistência, embora não permita às bactérias sobreviverem na presença de uma fluoroquinolona, aumenta substancialmente o número de mutantes que podem ser seleccionados. No caso de QnrA, este fenómeno foi demonstrado para *E. coli* e *Enterobacter spp* e provavelmente aplica-se a outros géneros (Robicsek A. et al, 2006<sup>a</sup>).

## **5. 6 Ambiente genético dos genes *qnr***

Os plasmídeos que contém os genes *qnr* variam muito em tamanho e associações com outras resistências antibacterianas, no entanto, quase sempre possuem genes para múltiplas resistências (Robicsek A. et al, 2006<sup>a</sup>).

Os *qnrA* e algumas vezes *qnrB*, foram encontrados como parte de complexos de integrões tipo-sul1, contendo uma recombinase Orf513 (Figura nº 4). Tipicamente, genes de resistência e integrões estão associados ao o local de recombinação *59-base element* e

são situados imediatamente à 3L' de uma integrase. A ausência dessa ferramenta no *qnrA* sugere sua mobilização e integração no plasmídeo, ocorreu de modo pouco comum. A conservação desse arranjo atípico das *qnr* em plasmídeos de estirpes isoladas por mais de dez anos em partes distantes do mundo, sugere que houve disseminação de uma fonte comum e consequentemente modificação local (Robicsek A. et al, 2006<sup>a</sup>).

O *qnrB* está também associado a Orf1005 além da Orf513, e ainda a outros genes que não conferem resistência (Figura nº 4).

Nos plasmídeos que codificam para QnrS, sequenciados até o momento, o gene *qnrS* não está associado à integrões. Mas algumas vezes aparece ladeado por “*inverted repeats*”- IR (Figura nº 4). A associação dos *qnrA* e *qnrB* com as ESBLs tem sido observada numa série de estudos nos últimos anos. Um mecanismo para esta associação é a incorporação dos *qnr* e dos genes codificadores para ESBLs num mesmo plasmídeo. No entanto, os *qnr* e os genes codificadores para ESBLs têm sido encontrados em integrões distintos, sugerindo que foram adquiridos separadamente (Robicsek A. et al, 2006<sup>a</sup>).

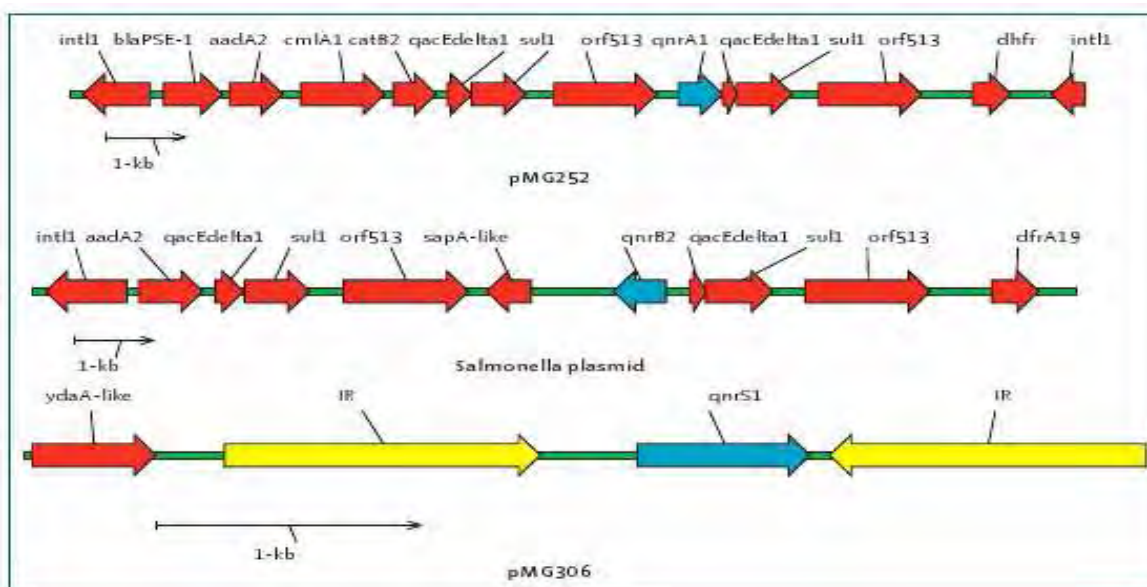


Figura nº. 4: Ambiente genético dos genes *qnr*. Integração tipo *sul1* do plasmídeo pMG252 do QnrA1 original (GAJ, dados não publicados), integração tipo *sul1* de um plasmídeo com QnrB2 encontrado em *Salmonella enterica* serotipo *Keurmassar* (Garnier et al. -- GenBank AM234698) e porção do plasmídeo pMG306 com QnrS1 encontrado em *Salmonella enterica* serotipo *Bovismorbificans*. Abreviações de genes: *aadA2*=aminoglycoside 3'-adenylyltransferase; *blaPSE-1*=PSE-1 âlactamase; *catB2*=chloramphenicol acetyltransferase; *cmlA1*=non-enzimatic chloramphenicol resistance protein; *dfrA* ou *dhfr*=dihydrofolate reductase; *intl1*=integrase; IR=*inverted repeat*; Orf=*open reading frame*, codificando geralmente uma proteína com função desconhecida; Orf513=*a putative recombinase*; *qacEA*=*quaternary ammonium compound resistance protein*; *qnr*=proteína de resistência às quinolonas; *sapA*=*peptide transport system permease component*; *sul1*=*dihydropteroate syntase*; *ydaA*=*a putative resolvase*. A escala para os diferentes plasmídeos varia e está indicada por uma seta de 1Kb (Robicsek A. et al, 2006<sup>a</sup>).

## 5. 7 Outros Aspectos Relevantes Sobre Qnr

Entre os aspectos mais relevantes acerca dos genes *qnr*, destaca-se o facto de serem mediados por plasmídeos, a sua descoberta ser relativamente recentemente e o seu mecanismo de acção ainda não estar completamente elucidado (Jacoby A. J., et al 2006).

Todas as Qnr descobertas até o momento conferem baixos níveis de resistência às quinolonas e são na realidade, mecanismos que aumentam a CMI destes antibacterianos. Portanto, não são capazes de conferir resistência às quinolonas (excepto o ác. nalidíxico) quando encontradas isoladamente. Precisam de estar associados a outros mecanismos de resistência às quinolonas para terem um efeito de nível elevado (Jacoby A. J., et al 2006).

Do ponto de vista clínico, as Qnr aumentam a concentração preventiva de mutações da ciprofloxacina em mais de 10x (0,2 a 3,2mg/L), portanto, facilitam o surgimento de mutantes com níveis elevados de resistência às quinolonas (Jacoby A. J., et al 2006).

No entanto, um estudo mais recente realizado com *qnr* em *E. coli* aponta para a possibilidade do envolvimento de outros mecanismos nesta selecção de bactérias com níveis de resistência mais elevados às quinolonas. Apesar da MPC dos transconjugantes ser aproximadamente 10 vezes maior do que nas estirpes sem os genes *qnr*, observou-se uma baixa frequência de mutações nas topoisomerasas destes transconjugantes. Somente 20% dos transconjugantes apresentaram mutações na DNA-girase comparados com 79% das estirpes sem *qnr* (Cesaro A., et al, 2008).

As *Enterobacteriaceae* ainda não desenvolveram um mecanismo de resistência único, mediado por plasmídeos, forte o suficiente para bloquear a acção das quinolonas. Ao invés disso, desenvolveram uma série de mecanismos para diminuir a actividade das quinolonas, como: Qnr, aminoglicosido acetiltransferase AAC(6')-IB-cr e QepA (bomba de efluxo para fluoroquinolonas hidrofílicas). Assim, elevados níveis de resistência às quinolonas não surgem de uma única vez, mas sim de forma gradativa, aditiva e independente (Robicsek A. et al, 2006<sup>a</sup>). Desta forma persistente, os patogéneos Gram-negativo agregam um conjunto de genes de resistência às quinolonas, que não são somente aditivos em efeito, mas que também oferecem um terreno favorável para a selecção *in vivo* de outros mecanismos de resistência cromossomais, durante e após o tratamento com o antibacteriano (Poirel L. et al, 2008).

Os PMQR não são uma boa notícia. A co-transmissão de PMQR com enzimas



modificadoras de aminoglicosídeos, ESBLs e mesmo carbanepenases, pode acelerar a velocidade do desenvolvimento das multirresistências bacterianas. Ao mesmo tempo, a disseminação destes plasmídeos em microrganismos aparentemente susceptíveis às quinolonas, acarreta preocupações acerca dos actuais *Breakpoints* utilizados para estes antibacterianos. Será que eles são apropriados? (Poirel L. et al, 2008).

Mas nem todas as notícias são más. Houve pelo menos uma instância em que as QnrA desapareceram de uma população de bactérias durante um período de tempo e a prevalência de Qnr em patogéneos Gram-negativo em EUA está relativamente estável nos últimos anos (Robicsek A. et al, 2006<sup>a</sup>).

A descoberta de PMQR nos últimos anos é muito peculiar e nos leva a várias questões como: estas descobertas reflectem o surgimento de um novo e complexo mecanismo de resistência ou simplesmente uma investigação mais aprofundada dos mecanismos de resistência já existentes em isolados clínicos mundialmente? Qual a relação entre as quinolonas (muito estáveis e pouco biodegradáveis) presentes no ambiente e a prevalência destes mecanismos? Há mais mecanismos PMQR a serem descobertos? Qual a dimensão do problema da disseminação destes mecanismos no ambiente? Em que dimensão a presença dos PMQR afectam o sucesso dos tratamentos de infecções clínicas com quinolona? (Poirel L. et al, 2008).

## 6. OBJETIVOS

Segundo informações de programas de vigilância (PNS, EARSS e ESAC), Portugal está entre os países da Comunidade Europeia com maior consumo de antibacterianos e apresenta elevada prevalência de microrganismos resistentes aos antibióticos de amplo espectro, entre os quais, as quinolonas. *Escherichia coli* é um dos patógenos mais comuns, em especial em infecções urinárias, onde se recorre frequentemente ao uso de quinolonas. Como é de conhecimento, as proteínas Qnr estão entre os actuais conhecidos mecanismos de resistência às quinolonas e os estudos sobre a epidemiologia dos genes codificadores destas proteínas são raros no país. Nesta perspectiva, o objectivo deste trabalho foi avaliar a prevalência dos genes *qnr*, nomeadamente; *qnrA*, *qnrB* e *qnrS*, numa colecção de isolados clínicos de *Escherichia coli* e avaliar a sua relação genética.

## 7. MATERIAIS E MÉTODOS

### 7.1 Isolados Clínicos

Os isolados clínicos de *Escherichia coli* foram gentilmente cedidos pelo serviço de Patologia Clínica dos Hospitais da Universidade de Coimbra (HUC). Foram recolhidos no período de cinco de Novembro a doze de Dezembro de 2007, oriundos somente de pacientes adultos. Os isolados clínicos de *E. coli* foram identificados com base nas características fenotípicas, através da utilização do sistema API 20E (*BioMérieux, Marcy L'Étoile*, França), no laboratório do próprio hospital.

O presente estudo envolveu uma colecção de duzentos e vinte isolados clínicos de *E. coli* de 2007. Foi considerado apenas um isolado clínico por paciente. Os isolados clínicos eram provenientes de diferentes amostras biológicas, como: sangue, urina, abscessos, exsudados de feridas cirúrgicas e não-cirúrgica, líquido peritoneal, entre outros; como também de diferentes áreas físicas do hospital, incluindo as urgências (pacientes da comunidade).

Ainda fizeram parte deste estudo (somente na pesquisa dos genes *qnr*), 25 isolados clínicos de *E. coli* produtoras de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado (ESBLs), recolhidos em 2004 e também provenientes do mesmo hospital.

### 7.2 Estirpes Bacterianas Padrão

Foram usadas como estirpes bacterianas padrão:

- *Klebsiella pneumoniae* 5 (controlo positivo de *qnrA* e *qnrB*);
- *Escherichia coli* H15: controlo positivo de *qnrS*. Estas duas estirpes que serviram de controlo positivo para os genes *qnr*, foram cedidas gentilmente pelo Laboratório de Biotecnologia Microbiana da Universidade de Aveiro.
- *Escherichia coli* ATCC 25922: controlo dos testes de susceptibilidade antimicrobiana, segundo regras de *Clinical and Laboratory Standart Institute* CLSI (2005).
- *Escherichia coli* J53 resistente a azida de sódio: utilizada como estirpe receptora na conjugação, doada pelo Doutor George Jacoby.

### **7.3 Conservação e Cultura das Bactérias**

Para a conservação a longo prazo, as bactérias foram congeladas a -80°C em caldo de tripticase de soja com 15% de glicerol. A curto prazo, foram mantidas a 4°C em placas de gelose de tripticase de soja. Para serem utilizadas, as bactérias foram descongeladas, cultivadas e isoladas em placas de gelose *MacConkey* e posteriormente cultivadas em placas de tripticase de soja agar a 37°C por 18 a 24h para uso em rotina laboratorial.

### **7.4 Testes de Susceptibilidade aos Antibacterianos**

O fenótipo de susceptibilidade aos antibacterianos foi determinado pelo Sistema Automatizado Vitek 2 *Advanced Expert System* (Vitek 2-AES, BioMérieux, Marcy L'Étoile, França) no próprio hospital. No nosso laboratório confirmou-se pelo método de difusão em agar com discos (método de Kirby-Bauer) susceptibilidade à ciprofloxacina e levofloxacina, de acordo com as normas de CLSI (2005).

#### **7.4.1 Teste Fenotípico de Detecção de $\beta$ -lactamases de Espectro alargado - Método de Difusão em Disco**

A detecção fenotípica de ESBLs pode ser realizada pelo método da difusão em placas de gelose Mueller-Hinton, com os seguintes discos de antibacterianos, a saber: ceftazidima (CAZ), cefotaxima (CTX), aztreonam (ATM), amoxicilina com ácido clavulânico (AMC) e cefoxitina (FOX).

A partir de uma cultura bacteriana de 18-24h de incubação à 37°C, preparou-se uma suspensão em soro fisiológico estéril com turvação semelhante ao grau 0,5 na escala de *McFarland*. Com uma zaragatoa previamente imersa nesta suspensão, uma placa de Muller-Hinton agar foi inoculada uniformemente (técnica de inoculação em toalha). Antes de passados 15min., os discos com antibacterianos foram aplicados sobre a superfície da placa na seguinte disposição: AMC no centro da placa e os restantes discos em volta, mantendo-se cerca de 15-20mm de distância entre os discos.

As placas foram incubadas de 18-24h a 37°C e posteriormente procedeu-se à leitura do diâmetro dos halos de inibição de crescimento com uma craveira. Os isolados foram

registados e classificados como produtores de ESBLs ou não-produtores de ESBLs, conforme regras recomendadas pelo CLSI (2005). Os isolados produtores de ESBLs apresentam uma extensão do halo de inibição de crescimento entre os discos de AMC, CTX, CAZ e ATM, que indica o sinergismo que ocorre entre o ácido clavulânico (inibição de ESBLs) e o  $\beta$ -lactâmico acima referido.

#### **7. 4. 2 Determinação da Concentração Mínima Inibitória – Método da Microdiluição em Meio Líquido**

Foram determinadas as CMI's para a ciprofloxacina pelo método da microdiluição em meio líquido, segundo normas da CLSI (2005).

Em placas com 96 poços estéreis foram colocados 100  $\mu$ l de caldo de Mueller-Hinton (Oxoid) em cada poço e adicionou-se 100 $\mu$ l do antibacteriano numa concentração de 4 $\mu$ g/ml, obtendo-se uma mistura com concentração a 2 $\mu$ g/ml. Depois foram transferidos 100 $\mu$ l da mistura do primeiro poço para o segundo, do segundo para o terceiro e assim sucessivamente, até que todos os poços foram contemplados com o antibacteriano, obtendo-se séries de concentrações de 1:2. A última coluna de poços (12<sup>o</sup>) foi deixada só com o meio de cultura para servir de controlo de viabilidade de crescimento bacteriano. Do décimo primeiro poço foram retirados 100 $\mu$ l e desprezados.

Foi preparada uma suspensão bacteriana dos isolados a serem testados, numa turvação semelhante à 0,5 da suspensão padrão da Escala de (aproximadamente 10<sup>8</sup>CFU/ml) e diluiu-se esta solução 10 vezes, de forma a obter aproximadamente 10<sup>7</sup>CFU/ml. Desta diluição, foram inoculados 5 $\mu$ l em cada poço, de forma a obter uma concentração final de 5x10<sup>5</sup>CFU/ml. Na primeira linha, foi inoculado uma suspensão bacteriana controlo, utilizando a *E. coli*J53 resistente a azida de sódio e sensível a todos os outros antibacterianos. As placas foram incubadas a 37<sup>o</sup> por 18 a 24h. No final deste tempo procedeu-se à leitura da CMI, definida como a menor concentração do antibacteriano em que não ocorre crescimento bacteriano visível a olho nu. Foram consideradas sensíveis os isolados com CMI 1 $\leq$  $\mu$ g/ml, resistentes os isolados com CMI 4 $\geq$  $\mu$ g/ml, intermédios os isolados com CMI entre 1 a 4 $\mu$ g/ml, conforme CLSI (2005).

#### **7. 5 Selecção dos Isolados Clínicos Para Pesquisa dos genes *qnrA*, *qnrB* e *qnrS***

Precedendo a pesquisa dos genes *qnr*, foi realizada uma análise do antibiograma dos isolados clínicos de *E. coli* recolhidos de 05/11 a 12/12 de 2007. Do total de 220 isolados clínicos foram separados somente os resistentes e com susceptibilidade reduzida (intermédio) à ciproflxacina e levofloxacina (n=69).

Nestes 69 isolados foi realizada uma minuciosa análise dos antibiogramas de modo a permitir o seu agrupamento em cinco grupos fenotípicos diferentes, considerando resistência ou susceptibilidade reduzida (intermédia) a pelo menos um antibacteriano de cada classe envolvida:

**Grupo I** - Resistentes ou com susceptibilidade intermédia à gentamicina e amicacina (aminoglicosídeos);

**Grupo II** - Resistentes ou com susceptibilidade intermédia à Sulfonamida/trimetoprim (sulfonamidas);

**Grupo III** - Resistentes ou com susceptibilidade intermédia à Nitrofurantoína;

**Grupo IV** - Resistentes ou com susceptibilidade intermédia à ampicilina e amoxicilina/ácido clavulânico (penicilinas);

**Grupo V** - Resistentes ou com susceptibilidade intermédia à cefalotina, ceftazidima, cefuroxima e cefotaxima (cefalosporinas).

Destes grupos, foram escolhidas 21 amostras representativas dos isolados clínicos de *E. coli* para pesquisa da prevalência dos genes *qnr*, conforme a enfermaria de origem, data de isolamento e associação com a produção de ESBLs (ver tabela nº 3 pág. 64). Estes factores foram envolvidos na escolha das amostras representativas com o intuito de abranger uma maior diversidade genética bacteriana.

Também foram escolhidos aleatoriamente nove isolados clínicos sensíveis à ciprofloxacina e levofloxacina, dentro da colecção de *E. coli* de 2007.

Além destes, os genes *qnr* foram pesquisados numa colecção de vinte e cinco isolados clínicos de *E. coli* produtoras de ESBLs recolhidas em 2004 no mesmo hospital, que já haviam sido objecto de estudos anteriores.

## **7. 6 Técnicas de Biologia Molecular**

### 7. 6. 1 Extracção do DNA Total Bacteriano

A extracção do DNA das bactérias que serviram de controlo positivo foi feita através da utilização de Kit de extracção de DNA *Acqua Pure Genomic DNA Isolation* da BioRad, com algumas modificações. As bactérias recém cultivadas foram suspensas em 300µl de *Genomic DNA Lysis Solution* e incubadas a 80° C por 5min. para que ocorresse a lise celular. A seguir, adicionou-se *RNase Solution* na concentração final de 20µg/ml ao lisado celular e inverteu-se o tubo, suavemente, várias vezes. Esta solução foi incubada a 37° C durante 45min. para que decorresse a degradação do RNA. A solução foi arrefecida até alcançar a temperatura ambiente, acrescentou-se 100µl de *Protein Precipitation Solution* e aplicou-se vortex por 20s. A seguir, centrifugou-se o tubo a 15000g por 3min. Nas amostras em que o sedimento não se apresentou muito espesso, repetiu-se o vortex e expôs-se o tubo a -20° C por 5min; sendo repetida também a centrifugação nas condições anteriores. O sobrenadante foi separado e colocado num tubo de centrifugação de 1,5ml limpo e acrescentou-se 100µl de isopropanol a 100%, invertendo-se o tubo diversas vezes e suavemente até o DNA precipitar. O DNA fica visível como filamentos vítreos. Centrifugou-se novamente o tubo a 15000g por 1min e desprezou-se o sobrenadante. O precipitado de DNA foi lavado com 300µl de etanol a 70% e centrifugado a 10000g por 1 min. O sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado foi secado a temperatura ambiente até a completa evaporação do etanol. A hidratação do DNA foi feita com 100µl de *DNA Hydration Solution* e incubado a 65° C por 5 min., ficando à temperatura ambiente por uma noite e guardado a -20° C até posterior utilização.

Dos isolados clínicos, o DNA foi extraído pela técnica descrita por Rademaker, J. L. W. & Brujin de F. J., (1997), como se segue:

As estirpes foram cultivadas em placas de tripticase de soja agar a 37° C por 18 a 24h. Suspendeu-se 1 colónia destas bactérias em 100µl de hidróxido de sódio a 0,05M e aqueceu-se por 15 min. à 100° C. A seguir foi centrifugado a 15.000rpm por 2min. O sobrenadante foi separado do sedimento, conservado a -20° C por uma semana no máximo e usado como fonte de DNA para as técnicas de biologia molecular.

### 7. 6. 2 Determinação da Concentração do DNA por Espectrofotometria

A concentração do DNA em amostras puras pode ser determinados por leitura da absorvância a 260 nm, comprimento de onda no qual as bases nitrogenadas do DNA absorvem. Uma unidade de densidade óptica a 260 nm corresponde aproximadamente a uma concentração de 50 µg/mL de DNA em cadeia dupla ou 40 µg/mL de DNA em cadeia simples ou RNA.

A razão entre a absorvância a 260 nm e a 280 nm informa sobre a pureza da amostra. Uma amostra pura de DNA apresenta uma razão de 1,8 e uma amostra pura de RNA apresenta uma razão igual a 2. A contaminação das amostras com proteínas ou fenol acarreta numa diminuição dessa razão.

As amostras foram diluídas com água de MilliQ estéril na proporção de 1:1000 e sua absorvância foi determinada usando como branco a água de MilliQ estéril pura. A concentração do DNA foi determinada recorrendo às correspondências já apresentadas.

### 7. 6. 3 Reacção de amplificação em cadeia – PCR dos genes *qnr*

Os genes *qnr* foram amplificados com uma técnica *Multiplex-PCR* com *primers* específicos, segundo Robicsek A., et al, (2006<sup>b</sup>), com a seguinte sequência nucleotídica e especificando-se também o tamanho esperado do amplicão:

<i>Primers</i>	Tamanho esperado do amplicão
<i>qnrA Forward</i> : 5'-ATTTCTCACGCCAGGATTTG-3'	516bp
<i>qnrA Reverse</i> : 5'-GATCGGCAAAGGTTAGGTCA- 3'	
<i>qnrB Forward</i> : 5'-GATCGTGAAAGCCAGAAAGG-3'	469bp
<i>qnrB Reverse</i> : 5'-ACGATGCCTGGTAGTTGTCC-3'	
<i>qnrS Forward</i> : 5'-ACGACATTCGTCAACTGCAA-3'	417bp
<i>qnrS Reverse</i> : 5'-TAAATTGGCACCCCTGTAGGC-3'	

A mistura de PCR utilizada foi com 20µl de volume final, dNTPs a 200µM, MgCl<sub>2</sub> a 1,7mM, cada *primer* a 0,2µM, tampão 1X e DNA Polimerase a 0,02U/µl (Finnzymes 503-L, Frilabo, Porto). A cada reacção de PCR foi acrescentado 1µl de DNA molde. Foram utilizadas como controlo positivo: *E. coli* H15 para *qnrS* e *K. Pneumoniae* 5 para *qnrA* e *qnrB*.

A reacção de PCR foi realizada sob as seguintes condições:



	95° C por 5 min.	desnaturação inicial
	94° C por 45s	Desnaturação
35X	53° C por 45s	hibridação dos <i>primers</i>
	72° C por 1min.	alongamento das cadeias de DNA
	72° C por 5min.	alongamento final das cadeias de DNA

Posteriormente, o gene *qnrS* foi pesquisado com um outro par de *primers*, cedidos pelo Laboratório de Biotecnologia Microbiana da Universidade de Aveiro, com a seguinte sequência de nucleótidos, especificando-se também o tamanho esperado para o amplificação:

<i>primer</i>	tamanho esperado do amplificação
<i>qnrS</i> Forward: 5' -CAATCATACAGGCACC -3'	616bp
<i>qnrS</i> Reverse: 5' -TCAGGATAAAATACCC -3'	

A reacção de PCR foi realizada sob as seguintes condições:

	95° C por 5 min.	desnaturação inicial
	94° C por 1min.	Desnaturação
35X	60° C por 1min.	hibridação dos <i>primers</i>
	72° C por 2min.	alongamento das cadeias de DNA
	72° C por 5min.	alongamento final das cadeias de DNA

A Mistura de PCR utilizada foi com 20µl de volume final, dNTPs a 200µM, MgCl<sub>2</sub> a 3mM, cada *primer* a 0,2µM, tampão 1X e DNA Polimerase a 0,02U/µl (Phusion™ Fidelity). A cada reacção de PCR foi acrescentado 1µl de DNA molde. Foi utilizada a estirpe *E. coli* H15 como controlo positivo para *qnrS*.

#### 7. 6. 4 Estudo da Relação clonal dos isolados de *Escherichia coli* seleccionados para pesquisa dos genes *qnr*

A relação clonal dos isolados de *E. coli* foi avaliada pelo método de ERIC-PCR (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*). Foram utilizados os seguintes *primers*, conforme descrito por Versalovic et al, (1991).

ERIC 1 5'- ATGTAAGCTCCTGGGGATTCA C-3'
---------------------------------------

ERIC 2 5'- AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'
--------------------------------------

As condições de PCR usadas foram:

	95° C por 7 min.	desnaturação inicial
	94° C por 1min.	Desnaturação
35X	52° C por 1min.	hibridação dos <i>primers</i>
	65° C por 8min.	alongamento das cadeias de DNA
	65° C por 16min.	alongamento final das cadeias de DNA

A mistura de PCR utilizada foi com volume final de 50µl com 6mM de MgCl<sub>2</sub>, tampão 1X, dNTPS a 1mM, 15pmol de cada *primer* e 1U de DNA Polimerase (Phusion™ Fidelity). A cada reacção de PCR foi acrescentado 1µl de DNA molde com concentração de 50ng/µl extraído com Kit de Extração de DNA.

#### 7. 6. 5 Análise dos perfis obtidos por ERIC-PCR

As imagens dos perfis produzidos por ERIC-PCR, foram importadas para o software GelCompar II versão 5.0 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) para posterior análise. O dendrograma gerado com base nos padrões dos perfis produzidos por ERIC-PCR foi deduzido a partir do coeficiente de similaridade de Pearson através do *unweighted pair group method with arithmetic averages* (UPGMA) e aplicação de uma tolerância de 0,5%.

Os padrões das impressões digitais foram classificados com base no grau de similaridade calculado pelo GelCompar e segundo critérios de classificação descritos por Tenover et al (1997). Segundo este autor, os perfis são classificadas como indistinguíveis (quando não há diferenças no número e posição das bandas), geneticamente relacionadas (2 a 3 bandas diferentes), possivelmente relacionadas (4-6 bandas diferentes) e diferentes (7 ou mais bandas diferentes).

### 7. 6. 6 Visualização do Produto de Amplificação

Os amplicões foram analisados através de electroforese em gel de agarose (Agarose NA, Amersham Pharmacia Biotech) a 2% ou 0,7% (p/v) em tampão de TBE 1X (Tris-base 89mM, ácido bórico 89mM e EDTA a 2mM, pH 8) com brometo de etídeo a 50ng/ml. O amplicão foi misturado com tampão de carga (5ml de glicerol, 0,01g de azul de bromofenol, 0,219g de EDTA e 0,32g de Tris Base e completar até 10ml com água destilada) na proporção se 1:5 e aplicado nos poços do gel. A electroforese foi realizada a 80V num tampão de corrida TBE 0,5X (Tris-base a 44,5mM, ácido bórico 44,5mM e EDTA a 1mM, pH 8). Após a corrida, recorreu-se a um transiluminador UV para a visualização dos fragmentos de DNA amplificados. Utilizaram-se os marcadores de peso molecular de 1Kb (100bp até 10000bp) da BIORON e de 50bp(de 50bp até 1000bp) da Fermentas para comparação do tamanho do amplicão. Após visualização, o gel foi fotografado e as fotografias digitalizadas.

### 7. 6. 7 Extração e Purificação do Produto de Amplificação em Gel de agarose

A extração e purificação do amplicão a partir de gel de agarose foi realizada utilizando-se o *QIAquick Gel Extraction Kit* da QuiaGen. Após a sua visualização, o amplicão foi recortado do gel com uma lâmina de bisturi e colocado num tubo de *Eppendorf*. Foi adicionado tampão QG, na quantia de três vezes o volume do gel. A seguir foi incubado a 50°C por 10 min., até dissolver completamente o gel. Foi verificado se a coloração da mistura ficou similar ao amarelo do tampão QG. A mudança da cor amarela para laranja ou violeta indica mudança do pH (fica básico); e a absorção do DNA pela membrana do QIAquick só é eficiente a um  $pH \leq 7,5$ . Foi adicionado isopropanol à mistura, na quantia de uma vez o volume do gel. A mistura foi colocada na QIAquick *column* e foi centrifugada a 1000g por 1min. O volume escoado foi desprezado e a coluna recolocada no tubo de 2ml, ao que adicionou-se 0,5ml de tampão QG e centrifugou-se novamente, nas mesmas condições do passo anterior. Este passo removeu os últimos traços de agarose. A seguir lavou-se a membrana do QIAquick com 0,75ml de tampão PE e centrifugou-se a 1000g por 1min. O volume escoado foi desprezado e a coluna foi centrifugada por mais

1min. para remover completamente os resíduos de etanol do tampão PE. A coluna foi colocada num tubo de *Eppendorf* de 1,5ml limpo, foram adicionados 30µl de tampão EB para resuspende e hidratar o amplicão e a seguir, centrifugou-se a 1000g por 1min. Por fim, o amplicão foi conservado a 20°C para posterior sequenciação.

#### **7. 6. 8 Sequenciação do Amplicão**

O fragmento de DNA amplificado por PCR foi purificado recorrendo ao protocolo do *QIAquick Gel Extraction Kit* da Qiagen, já descrito anteriormente.

A concentração do fragmento purificado foi avaliada por comparação com um marcador de peso molecular comercial, recorrendo-se à electroforese em gel de agarose a 1% a 80V, seguido de observação no transiluminador UV.

As amostras foram sequenciadas recorrendo-se aos serviços do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra e da STAB VIDA. As sequências de nucleótidos obtidas foram analisadas recorrendo aos programas Chromas, *Blast* e à base de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

#### **7. 6. 9 Extração de DNA Plasmídico**

A extração de plasmídeos foi feita pelo método de Birnboim e Doly (1979). Este método foi usado com volumes de cultura inferiores a 10ml, com base no protocolo original. Os isolados clínicos foram incubados a 37°C em meio líquido de tripticase de soja por 18-24h. Desta cultura retiraram-se 3ml, que foram centrifugados. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi ressuspense em 100µl de tampão TE. Juntou-se a cada tudo 100µl de uma solução de NaOH a 0,4M e 100µl de uma solução de SDS a 20%. Os tubos foram invertidos muito suavemente de quatro a cinco vezes e foram colocados em gelo durante 5 minutos. De seguida, adicionaram-se 150µl de uma solução de acetato de potássio a 5M e pH de 4,8, que deve estar a 4°C. Os tubos foram invertidos rapidamente e colocados em gelo durante 10 minutos. A mistura foi centrifugada a 4000g/5min, e 400µl do sobrenadante foram transferidos para um outro tubo de *Eppendorf*, aos quais se adicionaram 400µl de fenol/clorofórmio na proporção de 1:1. Homogeneizou-se invertendo o tubo suavemente. Centrifugou-se a 4000g/5min. E transferiram-se 350µl do

sobrenadante para um novo tubo. Adicionou-se então, 700µl de etanol a 100%, mantido a -20°C para favorecer a precipitação do DNA plasmídico; misturou-se bem invertendo o tubo suavemente e aguardou-se 5min. A temperatura ambiente. De seguida, centrifugou-se a 4000g/5min., rejeitou-se o sobrenadante e adicionou-se 1ml de etanol a 70% para lavar o sedimento. Centrifugou-se novamente a 4000g/ 5min. O sedimento foi seco a temperatura ambiente e ressuspensão em 20µl de tampão TE, a que se juntou 1µl da solução de RNase (1mg/ml). O DNA plasmídico foi visualizado após electroforese em gel de agarose a 1% por 3h.

Também foi realizada extracção de DNA plasmídico através de *Plasmid Midi Kit* (25) da Qiagen e pelo método de Sambrook e colaboradores, no entanto, os resultados obtidos não foram satisfatórios.

#### **7. 6. 10 Transferência horizontal de genes – Conjugação**

Com o intuito de verificar a ocorrência de transferência horizontal dos genes *qnrS* entre as bactérias, foi realizada a técnica da conjugação *in vitro*. Foram usadas como dadoras as estirpes bacterianas que continham o gene *qnrS*, os isolados nº 51, 89 e 39 (o nº 39 representou também os nº 12 e 36) e como receptora a estirpe de *E. coli* J53 resistente a azida de sódio.

As estirpes dadoras e receptora foram cultivadas em caldo de tripticase de soja (Oxoid) a 37° C por 18-24h. Destas culturas transferiu-se 1ml para matrizes de 50ml de caldo de tripticase de soja, que se incubaram a 37° C com agitação, até se atingir a fase de crescimento exponencial (cerca de 3h). Na conjugação foram usados 100µl da cultura da estirpe dadora e 100µl da cultura da estirpe receptora, que foram colocadas sobre placas de meio de Mueller-Hinton agar. As duas culturas foram misturadas suavemente. As placas foram encubadas a 37° C durante 18-24h, permitindo um maior tempo de contacto entre as bactérias. Após este tempo de incubação, foram feitas suspensões bacterianas da mistura de células dadoras e receptoras, com diluições de 1:10 em água MilliQ estéril (diluições entre 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-7</sup>). De cada diluição se retiraram 100µl, que foram semeados com zaragatoa em meio de selecção Mueller-Hinton agar com azida de sódio a 180µg/ml e ciprofloxacina a 0,5µg/ml, para os isolados 39 e 89; para o isolado 51 foi utilizada ciprofloxacina a 0,125µg/ml a azida de sódio a 200µg/ml (o isolado 51 apresentava mutações até 180µg/ml

de azida de sódio). Também foram inoculadas placas com meio selectivo para servirem de controlo. Nestas placas, as estirpes dadora e receptora foram inoculadas separadamente. O inóculo dos controlos teve turvação de 0,5 na Escala de *McFarland*. Posteriormente, as placas foram incubadas a 37° C por 18-24h.

Os transconjugantes foram isolados e cultivados a 37° C durante 18-24h. A seguir foi realizado PCR para detecção do gene *qnrS* e o teste de susceptibilidade à ciprofloxacina através do método da microdiluição em meio líquido, para verificar se houve aumento da CMI da ciprofloxacina após aquisição do gene *qnrS*.

## 8. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 8. 1. Dados Epidemiológicos

#### 8. 1. 1 Distribuição dos isolados clínicos nas áreas físicas do hospital

A figura nº 5 mostra a frequência de isolados clínicos de *E. coli* recolhidos entre 05/11 a 12/12 de 2007 nos HUC por enfermarias. Assim, pode observar-se que, dos 220 isolados clínicos de *E. coli* recolhidos, a maior percentagem apareceu nas enfermarias de Medicina I, II e III (Homens e Mulheres), representando 27% do total. As enfermarias de Urologia-Transplante renal e Nefrologia representam 16% do total de isolados, sendo apenas 0,9% destes isolados provenientes de sangue venoso, sendo os demais, isolados a partir de urina. Logo a seguir aparecem as Urgências, apresentando 15% do total. Em contrapartida, nas restantes unidades físicas do hospital esta distribuição é mais homogênea.

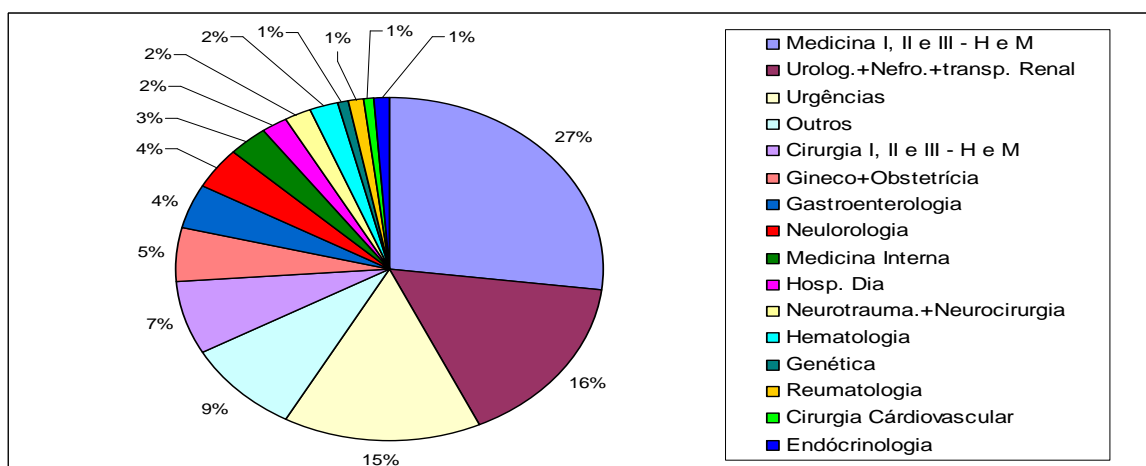


Figura nº 5: Distribuição dos isolados clínicos de *Escherichia coli* recolhidos de 05/11 a 12/12 de 2007, segundo a enfermaria de origem.

#### 8. 1. 2 Distribuição dos Isolados Clínicos Conforme Produto Biológico de Origem

Embora *Escherichia coli* seja considerado o microrganismo modelo na investigação científica em microbiologia e se conheça muito melhor sua estrutura genética e relativas

funções dos seus genes do que em outras bactérias, até hoje não é compreendido claramente o seu papel como principal patógeno em humanos. *E. coli* aparece em primeiro lugar como agente etiológico em infecções do tracto urinário (ITUs), bacteriêmias, gastroenterites, entre outros. Sob circunstâncias apropriadas *E. coli* é capaz de infectar a maioria dos tecidos do nosso corpo e estas infecções podem variar desde leves e auto-limitantes até severas com risco de vida (White et al, 2005).

Somente no tracto urinário, é responsável por mais de 80% das infecções. Tendo em conta que, este tipo de infecções representa a segunda causa mais comum de consultas da população em hospitais, pode avaliar-se o impacto que este patógeno tem na prática clínica (Gómez J., 2007).

Estirpes de *E. coli* com capacidades de infectar tracto urinário são denominadas de *E. coli* uropatogénicas. Normalmente, são bactérias comensais do próprio homem que adquirem um conjunto de factores de virulência codificados por ilhas de patogenicidade (Romek M. & Brauner A., 2007).

Num estudo realizado em *E. coli* provenientes de diferentes hospitais e regiões do Brasil, 76,4% do total de isolados clínicos eram provenientes de pacientes com UTI, 3,5% de culturas sanguíneas e os demais estiveram distribuídos de forma mais equilibrada entre exsudados de feridas, líquido peritoneal, entre outros (Pereira et al, 2007).

No presente trabalho, 77% do total de 220 isolados de *E. coli* eram provenientes de urina, como pode ser observado na figura nº 6. Não foi realizado nenhuma análise para associar as infecções urinárias com o uso de cateteres vesicais de longa permanência. Os isolados oriundos de hemoculturas aparecem em segundo lugar e os restantes isolados tem uma distribuição mais homogénea entre exsudados de feridas não cirúrgicas (NC), feridas cirúrgicas (C) e líquido peritoneal. Quando comparado com os resultados obtidos no estudo acima referenciado, observa-se uma grande semelhança na distribuição dos isolados clínicos quanto a sua origem biológica.



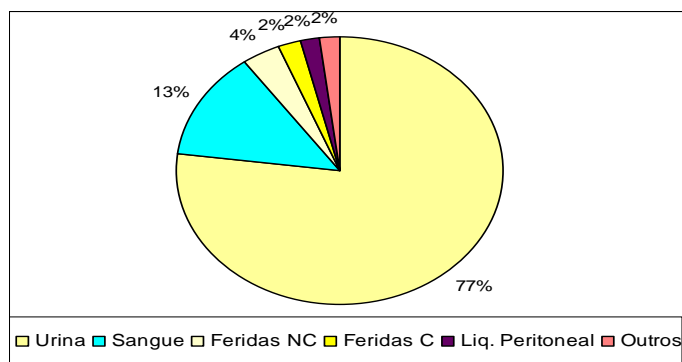


Figura nº 6: Distribuição dos isolados clínicos de *Escherichia coli* recolhidos de 05/11 a 12/12 de 2007, segundo a sua origem biológica.

### 8. 1. 3 Distribuição dos Isolados Clínicos Segundo Faixa Etária dos Utentes Afectados e sua Relação com a Susceptibilidade à Ciprofloxacina

Entre o total de 220 isolados clínicos que foram envolvidos neste estudo, observou-se uma prevalência mais acentuada nos indivíduos de 61 a 80 anos (Figura nº 7). Quando considerados somente de isolados resistentes à ciprofloxacina a prevalência é igualmente acentuada. Isto provavelmente está relacionado com o facto da população de Portugal estar a envelhecer, como o está em toda a Europa, e associado ainda à maior fragilidade imunológica dos idosos e à hospitalização mais frequente das pessoas desta faixa etária. Além disso, estes indivíduos são normalmente mais susceptíveis a doenças crónicas como diabetes; problemas como incontinência urinária; doenças que afectam o sistema nervoso central e, consequentemente, o controle motor, incluindo os músculos envolvidos na micção (necessitam do uso de cateteres vesicais de longa permanência); baixa produção de estrogénio no caso das mulheres e diminuição da actividade bactericida prostática nos homens, entre outros.

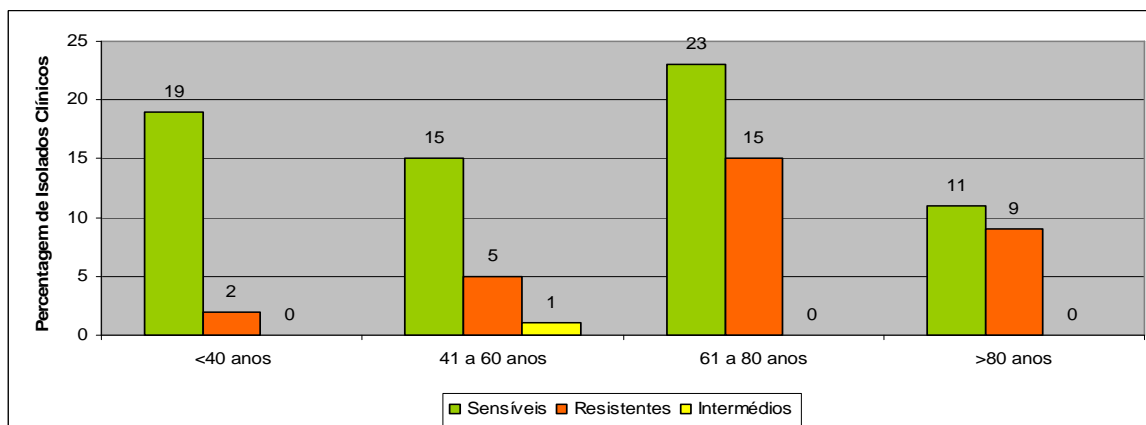


Figura nº 7: Distribuição dos isolados clínicos de *Escherichia coli* recolhidos de 05/11 a 12/12 de 2007, segundo o fenótipo de susceptibilidade à ciprofloxacina, associado à faixa etária dos utentes.

#### 8. 1. 4 Distribuição dos Isolados Clínicos Segundo o Sexo dos Utentes Afetados

As ITUs são enfermidades muito comuns e frequentes entre as mulheres. Estima-se que mais da metade das mulheres terá uma ITU sintomática ao longo de sua vida e que 25% apresentará ITUs recorrentes. Os factores de risco relacionados com ITUs em mulheres jovens são: gravidez, relações sexuais, uso de espermicidas e diafragmas, além de ITU prévia. Nas mulheres com idade mais avançada os factores de risco são: incontinência urinária, diabetes, baixa produção de estrogénio e doenças neurológicas, entre outros. Nos homens as ITUs são mais comuns em idade avançada e relacionadas com alguma anomalia anatómica ou diminuição da actividade bactericida prostática. Quando se desenvolve em homens jovens, normalmente está relacionado com a debilidade do sistema imunológico, relações sexuais com mulheres colonizadas com bactérias uropatogénicas e homossexualidade (Hernández-Burroezo, J.J. et al, 2007).

Em investigações recentes, foi descoberto que algumas mulheres têm predisposição genética para desenvolverem ITUs e que algumas estirpes de *E. coli* uropatogénicas têm a capacidade de se evadir dos mecanismos de defesa do corpo e formar comunidades de microrganismos ou biofilmes dentro das células da bexiga. Acredita-se que uma grande percentagem das ITUs recorrentes pode estar relacionada com esta capacidade das bactérias, tendo em conta que é muito difícil de se tratar qualquer doença que envolva colonização intracelular. No entanto, face a este novo conhecimento podem surgir novas perspectivas de desenvolvimento de novos tratamentos para as ITUs (Stamm W. E., 2006).

No presente estudo, verifica-se uma notável diferença das infecções causadas por *E. coli* entre os indivíduos de sexos diferentes. Do total de 220 isolados clínicos de *E. coli* recolhidos em 2007, 69% foram isolados em utentes do sexo feminino, dentre os quais 86,2% eram provenientes de urina. Somente 31% do total de *E. coli* foram isolados em amostras biológicas de utentes do sexo masculino, dos quais somente 55,8% eram oriundos de urina (Figura nº 8).

Provavelmente, a maior prevalência de infecções causadas por *E. coli* em mulheres, que se observa nesta análise (Figura nº 8), está relacionada com o facto das mulheres se apresentarem mais susceptíveis a UTIs, pelas razões acima indicadas.

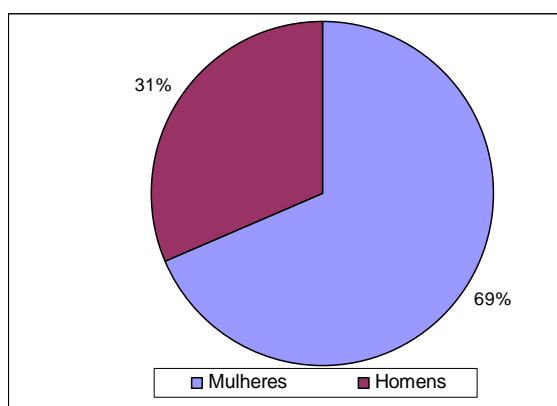


Figura nº 8: Distribuição de isolados clínicos de *Escherichia coli* recolhidos de 05/11 a 12/12 de 2007, segundo o sexo do paciente afectado.

### 8. 1. 5 Susceptibilidade aos Antimicrobianos

A susceptibilidade aos antimicrobianos foi determinada no laboratório do próprio hospital através de métodos comerciais (*Vitek System*, *BioMérieux*, *Marcy l'Étoile*, França) para vários antibacterianos, nomeadamente ampicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, cefalotina, cefuroxima, cefotaxima, ceftazidima, meropenemo (para os resistentes às cefalosporinas), ciprofloxacina, levofloxacina, gentamicina, ampicilina (para os resistentes à gentamicina), Sulfametoxazol/ trimetoprim, piperacilina/tazobactam e nitrofurantoína.

Dos isolados clínicos de *Escherichia coli* envolvidos neste estudo (n=220), 100% apresentaram sensibilidade ao meropenemo, piperacilina/tazobactam e ampicilina.

A resistência à ampicilina apresenta-se elevada (Figura nº 9), correspondendo a 61% do total de isolados clínicos. Já a amoxicilina/ácido clavulânico apresenta uma taxa de

resistência muito inferior (13%). O ácido clavulânico inibe a produção de  $\beta$ -lactamases e favorece a acção antibacteriana da amoxicilina.

As cefalosporinas de primeira geração (representadas pela cefalotina) apresentam-se como um grupo de antibacterianos pouco eficazes no tratamento das infecções causadas por *E. coli*, com 19% dos isolados a mostrarem-se resistentes e 31% como intermédios (Figura nº 9).

Embora a produção e disseminação das  $\beta$ -lactamases de Espectro Alargado (ESBLs) esteja aumentando assustadoramente entre as bactérias de interesse clínico, as cefalosporinas de terceira e quarta geração apresentam-se como um grupo de antibacterianos com uma taxa de actividade bactericida relativamente boa contra isolados de *Escherichia coli* envolvidos neste trabalho. As taxas de resistência para cefuroxima, cefotaxima e ceftazidima representam 10% dos isolados para cada antibacteriano. No entanto, quando avaliada a susceptibilidade intermédia, a cefuroxima apresenta uma diferença bastante acentuada, correspondendo a 5%, contra 0% e 1% de cefotaxima e ceftazidima, respectivamente. Um facto coerente se considerar que a cefuroxima é de segunda geração e as outras de terceira geração (Figura nº 9).

As sulfonamidas apresentam alguma actividade contra os isolados clínicos de *E. coli*, sendo a percentagem de isolados resistentes igual a 34% (Figura nº 9). No entanto, seria mais prudente realizar o teste de susceptibilidade antibacteriana antes de recomendar uma terapia à base destes fármacos, tendo em conta o alto nível de resistência encontrado.

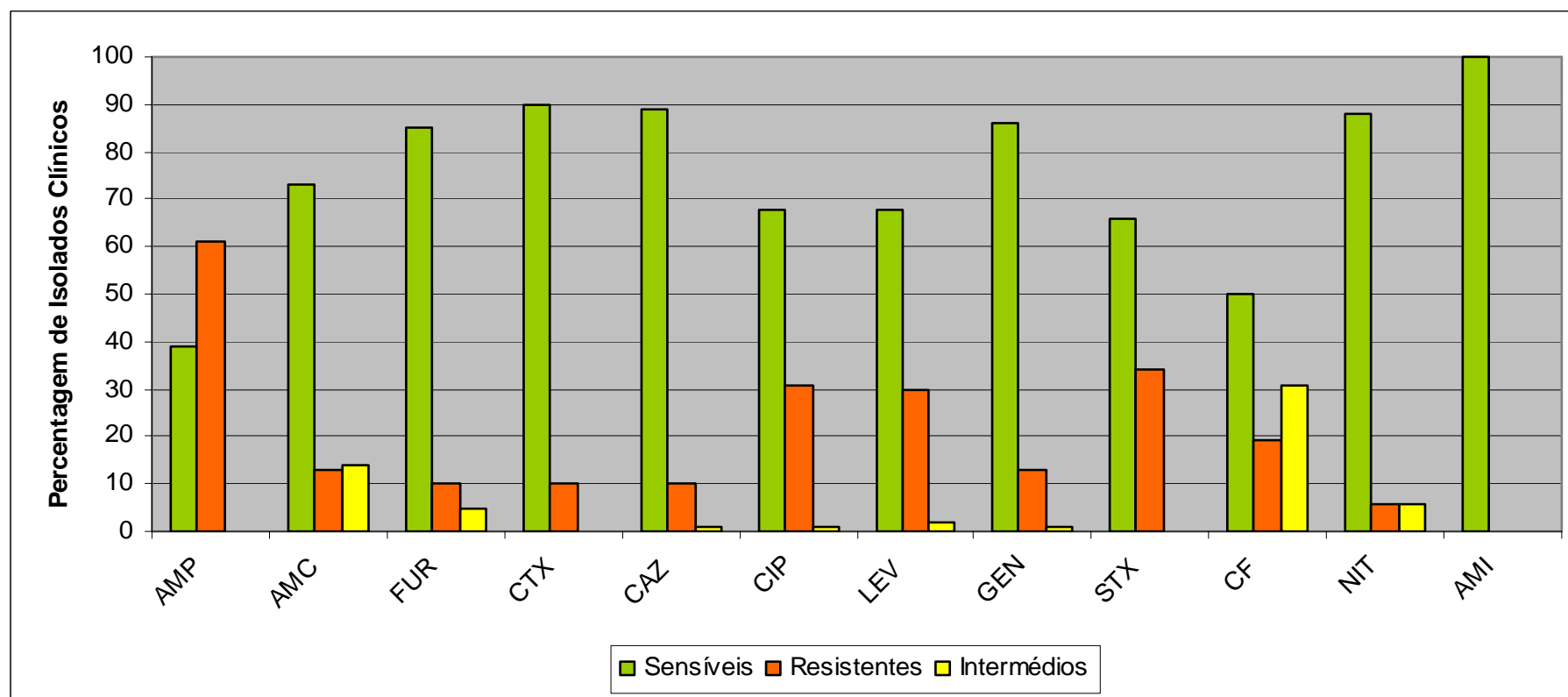
Da classe dos aminoglicosídeos, a gentamicina aparece com a maior taxa de resistência, sendo 1,5% e 13% dos isolados intermédios e resistentes, respectivamente. Em contrapartida, a amicacina apresenta-se com alta eficácia, sendo 100 % dos isolados susceptíveis (Figura nº 9).

A classe das quinolonas apresenta 30 a 31% de resistência entre os isolados clínicos (ver Figura nº 9). Como a resistência às quinolonas (um dos mecanismos – *qnr*) é um dos principais objectos deste estudo, adiante será discutido mais detalhadamente quanto a sua associação com infecções adquiridas na comunidade e mudanças que incutiram no contexto clínico, no que concerne a escolha dos tratamentos com antibacterianos.

Vinte e três por cento dos isolados clínicos de *E. coli* apresentaram resistência a três ou mais classes de antibacterianos. Entre as classes testadas estão as penicilinas, cefalosporinas, quinolonas, aminoglicosídeos, sulfadiazidas, carbapenemos,

nitrofurantoína. Esta percentagem difere bastante da média nacional geral registada em 2006 pelo EARSS, em que apenas 7,4% das *E. coli* se apresentaram multirresistentes ([http://www.rivm.nl/earss/result/Monitoring\\_reports/Annual\\_reports.jsp](http://www.rivm.nl/earss/result/Monitoring_reports/Annual_reports.jsp))

*Escherichia coli* é o patogéneo de maior importância nas infecções em humanos e, como tal, o uso de antibacterianos para tratar essas infecções também é muito comum, especialmente os da classe das quinolonas. O desenvolvimento de mecanismos de resistência aos antibacterianos surge como uma consequência inevitável devido ao seu uso intenso e indiscriminado. Adquirir e transferir mecanismos de resistência é uma capacidade especial que *E. coli* apresenta. Além disso, é um microrganismo que pode exibir resistências a múltiplas classes de antibacterianos concomitantemente. Há estudos que associam o uso mais intenso de antibacterianos na actualidade como um factor do aumento de bactérias multirresistentes (White et al, 2005, Gómez G. J, 2007, Denton M, 2007). No contexto actual, as multirresistências representam um grande desafio no tratamento das infecções causadas por *E. coli*, principalmente quando estão incluídas resistências aos antibacterianos de amplo espectro como as fluoroquinolonas e cefalosporinas de última geração, que constituem o tratamento de primeira escolha, por serem de fácil uso pelo utente (eficazes na sua forma oral).



**Figura 9:** Distribuição dos isolados de *Escherichia coli* recolhidos de 05/11 a 12/12 de 2007, segundo a susceptibilidade a ampicilina (AMP), amoxicilina/CA (AMC), cefuroxima (FUR), cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ), ciprofloxacina (CIP), levofloxacina (LEV), gentamicina (GEN), Sulfametazol/trimetoprima (STX), Cefalotina (CF), nitrofurantoína (NIT) e amicacina (AMI).

### 8. 1. 6 Susceptibilidade às Quinolonas

O desenvolvimento de mecanismos de resistência às quinolonas pelas bactérias Gram-negativo constitui uma notável história de sucesso destes microrganismos. Quando introduzidas no contexto dos tratamentos clínicos, as quinolonas tiveram efeitos bactericidas em quase todas as *Enterobacteriaceae* clinicamente importantes a concentrações clínicas. Por se tratar de agentes antibacterianos de origem meramente sintética, acreditava-se ser pouco provável que as bactérias adquirissem mecanismos de resistência às mesmas, assumindo-se que não estavam disponíveis na natureza genes de resistência às quinolonas que pudessem ser recrutados em elementos genéticos móveis e disseminados entre as bactérias. Como acontece com muitos agentes antibacterianos de origem biológica, o próprio organismo produtor oferece os genes de resistência para a natureza, especialmente em mecanismos de resistência envolvidos na modificação ou inativação enzimática do fármaco. Além desta suposta vantagem, as fluoroquinolonas facilmente alcançam mil vezes o nível sérico necessário para inibir o crescimento das bactérias. Desta forma, mesmo que as bactérias pudessem desenvolver mutações que diminuíssem a susceptibilidade às fluoroquinolonas, a potência destes agentes era tal, que uma estirpe de *E. coli* selvagem teria que desenvolver espontaneamente duas ou mais mutações de resistência para conseguir sobreviver em concentrações clínicas do fármaco. Visto que, mutações independentes geralmente acontecem uma vez em  $10^7$  divisões celulares ou menos, parece pouco provável que múltiplas mutações pudessem acontecer num mesmo clone. Portanto, as fluoroquinolonas pertenciam a uma classe de antibacterianos com os quais a resistência por mutação parecia ser pouco provável se desenvolver e os genes de resistência não podiam ser adquiridos horizontalmente.

No entanto, em vinte anos, após a sua introdução na clínica, a resistência de *Enterobacteriaceae* tornou-se muito comum, está mundialmente disseminada e é digno de nota que, geralmente não se trata de disseminação clonal. Isto indica que a resistência às fluoroquinolonas pode ter surgido em microrganismos que outrora já foram totalmente susceptíveis.

Em estudos recentes envolvendo bactérias entéricas de uma Unidade de Cuidados Intensivos dos EUA, 10% destes microrganismos eram resistentes à ciprofloxacina. Níveis de 40% de resistência às quinolonas em isolados clínicos de *E. coli* Hong Kong têm sido

reportados. Em média 25% dos indivíduos saudáveis vivendo em Barcelona, têm os intestinos colonizados com *E. coli* resistentes às quinolonas (Robicsek et al, 2006<sup>a</sup>).

Em um estudo realizado em *Enterobacter spp* e *K. pneumoniae* recolhidos de 1990 a 2005 em Israel, para verificar a mudança no perfil de susceptibilidade e a prevalência de genes *qnr*, observou-se um aumento significativo e preocupante da resistência às fluoroquinolonas nestes microrganismos. De 1990 a 1993, apenas 0,5% *Enterobacter spp* eram resistentes à ciprofloxacina. De 1993 a 2005, 7,8 % deste mesmo género eram resistentes à ciprofloxacina. Em *K. pneumoniae* 12,9% dos isolados de 1991 a 1995 apresentavam-se resistentes à ciprofloxacina e, dos isolados de 1996 a 2005, 35,6% apresentaram resistência à ciprofloxacina (Strahilevitz et al, 2007).

No Reino Unido durante a década de 90 houve um contínuo e lento aumento da resistência às quinolonas em *E. coli* isoladas de pacientes com bacteriémia; de 0,8% em 1990 a 2,1% em 1996 e novamente para 5,2% em 2001. Dos isolados de *E. coli* recolhidos em 2006, foi verificado um aumento para 16,6% de resistência à ciprofloxacina. Níveis semelhantes de resistência a este fármaco foram observados noutros géneros das *Enterobacteriaceae* recolhidos em pacientes com bacteriémia no mesmo período; com 13.5% em *Klebsiella spp.*, 10.3% em *Enterobacter spp.*, 8.6% em *P. mirabilis*, 10.0% em *M. Morganii*, 3.6% em *Citrobacter spp.* e 21.3% em *Serratia spp.*

Face ao exposto, fica evidente que a resistência às fluoroquinolonas está a aumentar nas populações de *Enterobacteriaceae* em geral, não afectando somente *E. coli*.

Vários estudos realizados nos últimos anos mostraram que num mesmo elemento genético móvel podem estar localizados genes de resistência às fluoroquinolonas, cefalosporinas, aminoglicosídeos entre outros. Recentemente foi mostrado que, 89,4% de *Enterobacteriaceae* produtoras de beta-lactamases CTX-M, também apresentavam resistência à ciprofloxacina. Em contrapartida somente 48,3% das *Enterobacteriaceae* produtoras de outras ESBLs eram resistentes à ciprofloxacina (Denton M, 2007).

Neste estudo, de um total de 220 isolados clínicos de *E. coli* recolhidos em 2007, 31% apresentaram o fenótipo de resistência à ciprofloxacina (Figura nº 10). Esta percentagem de resistência está levemente superior à média nacional registada pelo EARSS em 2006, que era de 28%. A resistência às fluoroquinolonas numa percentagem tão elevada torna-se particularmente preocupante, pois reduz em muito as alternativas de tratamentos das infecções causadas por *E. coli*, uma vez que muitos estudos evidenciam a



co-produção de mecanismos de resistência como as ESBLs, juntamente com a resistência às fluoroquinolonas. Como em muitos casos os genes de resistência a diferentes classes de antibacterianos estão localizados no mesmo elemento genético móvel, o uso de um único antibacteriano pode manter a pressão selectiva para vários antibacterianos simultaneamente.

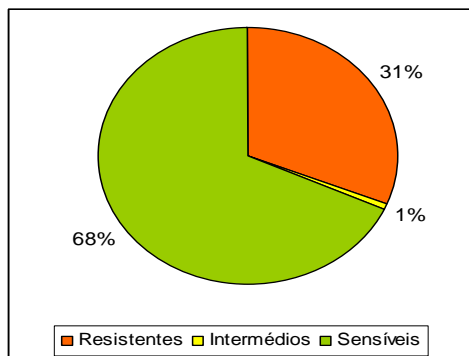


Figura nº 10: Fenótipo de susceptibilidade à ciprofloxacina em isolados clínicos de *Escherichia coli* recolhidos entre 05/11 a 12/12 de 2007.

### 8. 1. 7 As Quinolonas e as Infecções Adquiridas na Comunidade

As quinolonas são agentes antibacterianos largamente usados na aquacultura e na veterinária. Como é uma molécula muito estável no meio ambiente, inclusive nos ambientes aquáticos, o seu uso indiscriminado e exagerado nestas áreas provavelmente está associado ao envolvimento de microrganismos resistentes às quinolonas nas infecções oriundas da comunidade (Cattoir et al, 2008).

Se nos reportarmos a cinco ou dez anos atrás, verificamos que *Enterobacteriaceae* resistentes às fluoroquinolonas eram um problema ocasional, ocorrendo basicamente em locais de alto risco como as Unidades de Terapia Intensiva onde se faz uso intenso e prolongado destes antibacterianos, pacientes complicados que receberam tratamentos com múltiplos antibacterianos ou com o sistema imunológico afectado. Actualmente, ao contrário, nos deparamos com pacientes nos quais não distinguimos nenhum factor de risco (hospitalização recente, idade avançada, sistema imunológico comprometido, entre outros) e no entanto, podem apresentar uma infecção por um microrganismo multirresistente.

Face ao exposto, percebe-se que a escolha do tratamento antibacteriano adequado está assumindo novos contornos e está cada vez mais a dificultar a prática médica, considerando que as fluoroquinolonas juntamente com as cefalosporinas eram vistas como

uma escolha fácil e confiável para tratar infecções provenientes da comunidade e causadas por *Enterobacteriaceae*. Como consequência desse facto, estão sendo utilizados cada vez mais aminoglicosídeos (para os quais as bactérias já desenvolveram mecanismos de resistência) e carbapenemos, o que pode levar ao surgimento de mecanismos de resistência as carbapenemos num futuro bem próximo (Denton M, 2007).

Neste estudo, de um total de 33 isolados clínicos de *E. coli* recolhidos em 2007 na Urgência, 39% apresentaram resistência à ciprofloxacina (Figura nº 11). Quando comparados com a prevalência geral de isolados clínicos de *E. coli* resistentes à ciprofloxacina (Figura nº 10), as bactérias oriundas de utentes da Urgência apresentam um fenótipo de resistência ao mesmo antibacteriano, superior em 8,5%. Assumindo que os isolados da Urgência provêm da comunidade e que não tiveram nenhum contacto anterior com o ambiente hospitalar, isso significa que, provavelmente no meio ambiente do distrito de Coimbra há bactérias de interesse clínico resistentes às fluoroquinolonas ou, microrganismos que servem como reservatórios de genes de resistência e que são posteriormente disseminados por transferência horizontal, entre as bactérias clinicamente importantes.

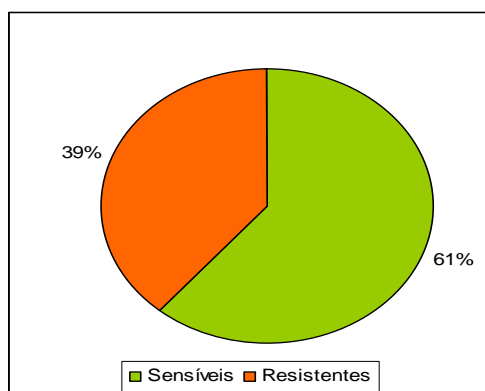


Figura nº 11: Distribuição dos isolados clínicos de *Escherichia coli* recolhidos nas Urgências de 05/11 a 12/12 de 2007, segundo o fenótipo de susceptibilidade à ciprofloxacina.

## 8. 2 Escolha dos Isolados Clínicos Para Pesquisa dos Genes *qnr*

Para otimizar o trabalho da pesquisa dos genes *qnr* procedeu-se à selecção de amostras representativas dos isolados clínicos de *E. coli* resistentes e com susceptibilidade reduzida (classificados como intermédios) à ciprofloxacina e levofloxacina (n = 69). Os

isolados foram agrupados em cinco grupos fenotípicos e destes foram seleccionados um total de 21, conforme descrito no capítulo de Materiais e Métodos. Alguns grupos ficaram sobrepostos em função da multirresistência. Como resultado deste agrupamento e posterior selecção obteve-se os seguintes isolados clínicos representativos de *E. coli* resistentes e com susceptibilidade reduzida (intermédios) à ciprofloxacina e levofloxacina de 2007 (ver Tabela nº 3):

Isol.	CIP	LEV	GEN	AMI	STX	NIT	AMP	AMC	FUR	CTX	CAZ	CF	MEM	ESBL	Enfermaria	Data
47	R	R	R	S	S	-	R	R	R	R	R	R	S	POS	Medicina I	06/11/2007
131	R	R	R	S	R	S	R	I	S	S	S	S	-	NEG	Urologia	13/11/2007
298	R	R	R	S	R	I	R	R	S	S	S	S	-	NEG	URGÊNCIAS	26/11/2007
408	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	S	POS	Medicina II	03/12/2007
88	R	R	S	S	R	S	R	I	S	S	S	I	-	NEG	Medicina II	05/11/2007
51	I	I	S	S	R	-	R	S	S	S	S	R	-	NEG	Medicina I	05/11/2007
109	R	R	S	S	R	I	R	S	S	S	S	S	-	NEG	Ginecologia	06/11/2007
250	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	S	POS	Medicina III	14/11/2007
420	R	R	R	S	R	-	R	R	R	R	R	R	S	POS	Medicina II	03/12/2007
105	R	R	I	S	R	R	R	I	S	S	S	S	-	NEG	Medicina I	02/11/2007
161	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	POS	CIRÚRGICA III	06/11/2007
313	R	R	S	-	R	R	R	I	S	S	S	S	-	NEG	CIRÚRGICA II	22/11/2007
403	R	R	S	-	R	I	R	S	I	S	S	R	-	NEG	Medicina II	30/11/2007
94	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	POS	MEDICINA III M	05/11/2007
154	R	R	S	-	S	S	R	R	S	S	S	R	-	NEG	Cirurgia III H	07/11/2007
378	R	R	R	S	S	-	R	I	R	R	R	R	S	POS	Neurotraumat	26/11/2007
449	R	R	I	S	R	T	R	I	S	S	S	R	-	NEG	URGÊNCIAS	06/12/2007
49	R	R	R	S	S	-	R	R	R	R	R	R	-	POS	Medicina I	05/11/2007
89	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	POS	Medicina III H	05/11/2007
467	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	-	POS	Pneumonol.	05/12/2007
419	R	R	R	S	S	R	R	I	R	S	S	R	-	NEG	URGÊNCIAS	04/12/2007

Tabela nº3: Isolados clínicos de *ESCHERICHIA COLI* SEGUNDO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIBACTERIANA, ENFERMARIA DE ORIGEM, PERÍODO DE RECOLHA E ASSOCIAÇÃO COM PRODUÇÃO DE  $\beta$ -LACTAMASES DE ESPECTRO ALARGADO. LEGENDA: R – RESISTENTES S – SENSÍVEIS I – INTERMÉDIOS. CIP–CIPROFLOXACINA, LEV–LEVOFLOXACINA, GEN–GENTAMICINA, AMI–AMICACINA, STX–TRIMETOPRIMA/SULFAMETAZOL, NIT–NITROFURANTOÍNA, AMP–AMPICILINA, AMC–AMOXICILINA/ÁC. CLAVULÂNICO, FUR–CEFUROXIME, CTX–CEFOTAXIME CAZ–CEFTAZIDIMA, CF–CEFALOTINA, MEM–MEROPENEM

### 8. 3 Pesquisa dos Genes *qnrA*, *qnrB* e *qnrS* Pela Técnica de PCR

Desde a primeira descoberta das proteínas Qnr no início da década de noventa, inúmeros estudos acerca do assunto têm sido realizados por investigadores nas mais diversas regiões do mundo (ver tabela nº 2 na página nº 33, 34 e 35). No entanto, a prevalência deste mecanismo de resistência em Portugal ainda não é conhecida. Como se sabe, Portugal está entre os países da Comunidade Europeia (CE) com os maiores índices de resistência bacteriana, sendo portanto, interessante que se desenvolvam conhecimentos acerca dos mecanismos de resistência envolvidos, entre eles as proteínas Qnr.

Embora ainda não esteja completamente elucidado o exacto funcionamento das proteínas Qnr na protecção das topoisomerase II às quinolonas, está bem definido que não representam um mecanismo de resistência suficientemente eficaz para conferir resistência às quinolonas quando encontrados isoladamente (Tran J. H., et al, 2005<sup>a,b</sup>). Porém, são capazes de aumentar a CMI das quinolonas de 4 a 64X, constituindo assim um mecanismo que favorece a selecção de microrganismos mutantes com níveis de resistência aumentados (Rodriguez-Martinez et al, 2006). Foi ainda demonstrado em alguns estudos, que as Qnr actuam adicionalmente a outros mecanismos de resistência às quinolonas, nomeadamente as mutações nas topoisomerasas II e nas porinas (Robicsek A. et al, 2006<sup>a</sup>). Mesmo na posse deste conhecimento e associado ao facto dos isolados clínicos em questão apresentarem níveis elevados de resistência às quinolonas, o presente estudo não avaliou a relação das proteínas Qnr com outros mecanismos de resistência às quinolonas.

Até ao presente momento, já foram identificadas dezanove variantes da proteína QnrB, seis variantes da QnrA e três variantes da QnrS em diferentes espécies de bactérias, sendo na sua grande maioria da família das *Enterobacteriaceae* (Jacoby G. et al, 2008).

Com o objectivo de estudar a prevalência das proteínas QnrA, QnrB e QnrS em isolados clínicos de *E. coli* recolhidos de utentes adultos no HUC, procedeu-se à pesquisa dos genes que as codificam, *qnrA*, *qnrB* e *qnrS*, respectivamente. Os genes *qnrA*, *qnrB* e *qnrS* foram pesquisados através da técnica de *multiplex-PCR*. Cada um dos genes foi considerado como existente quando verificada a existência de um fragmento de DNA amplificado com tamanho esperado para os *primers* específicos. O tamanho esperado do amplicão para os genes *qnrA*, *qnrB* e *qnrS* eram 516bp, 469bp e 417bp, respectivamente

(ver Figura nº 12).

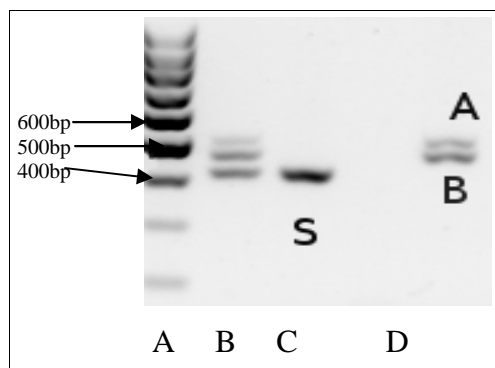


Figura nº 12: Fragmentos de DNA amplificados por PCR com tamanhos esperados para os *primers* específicos, em bactérias padrão que serviram de controlo positivo nos ensaios seguintes. Na coluna A, representa-se o marcador de peso molecular 50bp (GeneRuler<sup>TM</sup> da Fermentas); coluna B: fragmentos de DNA amplificados por *multiplex-PCR* correspondentes aos genes *qnrS*, *qnrB* e *qnrA* (de baixo para cima, respectivamente); coluna C: gene *qnrS* amplificado isoladamente; coluna D: genes *qnrB* e *qnrA* (banda inferior é *qnrB* e a superior é *qnrA*) amplificados na mesma reacção de PCR. Electroforese realizada em gel de agarose a 2% conforme descrito em Materiais e Métodos.

A reacção de *multiplex-PCR* (descrita em Materiais e Métodos) foi aplicada aos vinte e um isolados representativos de *E. coli* resistentes e com susceptibilidade intermédia à ciprofloxacina e levofloxacina. No entanto, somente um isolado apresentou um fragmento de DNA amplificado em torno dos 600bp, o que é diferente dos tamanhos esperados para os três pares de *primers*. Deste modo, procedeu-se com a aplicação de reacções de PCR com somente um par de *primers* (descrito por Robicsek A., et al, 2006<sup>b</sup>), fazendo portanto, uma reacção para cada gene pesquisado.

Entre todos os isolados clínicos investigados, nenhum apresentou os genes *qnrA* e *qnrB*. Entretanto, nove apresentaram amplificações inespecíficas (bandas pouco definidas e não na posição esperada) para o gene *qnrB* e cinco isolados clínicos apresentaram amplificações inespecíficas para o gene *qnrA*. Por se apresentarem com tamanhos próximos ao que era esperado, tais fragmentos de DNA amplificados foram sequenciados com o intuito de verificar se apresentavam homologia com os genes pesquisados. No entanto, ficou comprovado que se tratavam de amplificações de fragmentos do DNA genómico das bactérias, não correspondendo aos genes *qnrA* e *qnrB* (que se encontram em plasmídeos).

Por outro lado, nas reacções de PCR com os *primers* *qnrS*, todos os isolados

clínicos testados apresentaram um produto de amplificação com tamanho em torno dos 600bp e dois isolados apresentavam, ora um amplificação em torno dos 417bp, ora em torno dos 600bp. O ensaio foi repetido três vezes e sempre apresentava resultados semelhantes (ver exemplo na figuras nº 13 e 14). Como o produto de amplificação maior não coincidia com o tamanho esperado para o amplificação resultante dos *primers qnrS* e a sua prevalência era de 100% (resultado muito diferente de todos os outros estudos já desenvolvidos), procedeu-se com a sequenciação do amplificação. O resultado comprovou que de facto não se tratava do gene *qnrS*, mas sim de um gene cromossómico envolvido no transporte de potássio (97% de homologia).

O amplificação do *primer qnrS* (do isolado clínico 89) com o tamanho semelhante ao esperado também foi sequenciado e apresentou homologia com o gene *qnrS*.

Desta colecção de *Escherichia coli*, somente os isolados 89 e 51 apresentaram uma banda bem definida com o mesmo tamanho do controlo positivo (Figura nº 13, o isolado 89). Entretanto, outros oito isolados apresentaram um fragmento de DNA amplificado menos intenso e menos definido na mesma posição do controlo positivo (Figuras nº 13 e 14). Da colecção de *E. coli* de 2004, também dois isolados (isolados 36 e 39) apresentaram um amplificação com o tamanho esperado para o par de *primers qnrS*.

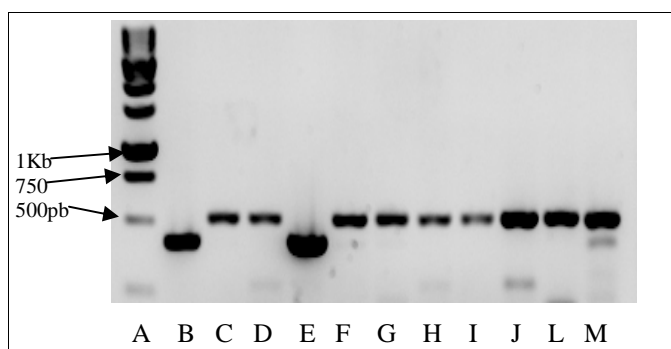


Figura nº 13: Reacção de amplificação de DNA com os *primers qnrS* (amplificação 417bp) em isolados clínicos de *Escherichia coli* resistentes e com susceptibilidade intermédia à ciprofloxacina e levofloxacina. Na coluna A representa-se o marcador de peso molecular 1kb (BioRon); na coluna B: controlo positivo e nas colunas C a M: isolados clínicos nº 47, 49, 89, 88, 94, 105, 109, 131, 154 e 161, respectivamente. Electroforese realizada em gel de agarose a 2% conforme descrito em Materiais e Métodos.

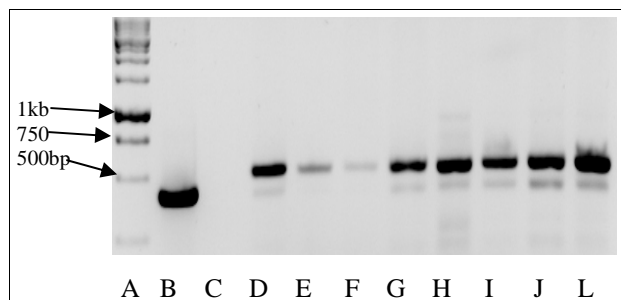


Figura nº 14: Reacção de amplificação de DNA com os *primers qnrS* (amplificação 417bp) em isolados clínicos de *Escherichia coli* resistentes e com susceptibilidade intermédia à ciprofloxacina e levofloxacina. Na coluna A representa-se o marcador de peso molecular 1kb (BioRon). Na coluna B, o controlo positivo. Nas colunas D a L, representam-se os isolados nº 250, 298, 403, 408, 419, 420, 449 e 467. Electroforese realizada em gel de agarose a 2% conforme descrito em Materiais e Métodos.

Para nos certificarmos dos resultados, procedeu-se com a pesquisa do gene *qnrS* com outro par de *primers* (tamanho esperado do amplificação = 616bp). Como resultado desta pesquisa, somente os isolados clínicos que apresentaram um produto de amplificação com tamanho de 417bp nos ensaios anteriores (isolados 36, 39, 51 e 89), apresentaram um amplificação com o tamanho esperado para o novo par de *primers*, que é de 616bp. Os restantes isolados não apresentaram nenhuma amplificação (Figura nº15).

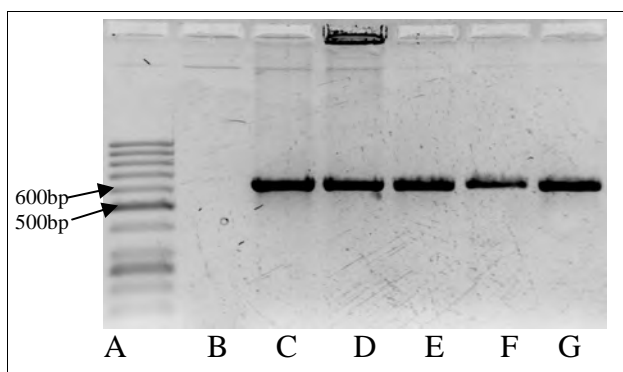


Figura nº 15: Amplificação do gene *qnrS* em isolados de *Escherichia coli*. Na coluna A representa-se o marcador de peso molecular 50bp (GeneRuler<sup>TM</sup> da Fermentas). Na coluna C representa-se o controlo positivo e nas colunas D a G, os isolados nº 36, 39, 51 e 89, respectivamente. Electroforese realizada em gel de agarose a 2% conforme descrito em Materiais e Métodos.

Em conclusão, os isolados clínicos representativos de *E. coli* de 2007 resistentes e com susceptibilidade intermédia à ciprofloxacina e levofloxacina, somente os isolados nº



51 e nº 89 (9,5%) apresentaram o gene *qnrS* (Figura nº 15 e tabela nº 4).

Dos isolados clínicos sensíveis à ciprofloxacina e levofloxacina, nenhum apresentou amplificação para os genes pesquisados.

Da colecção de isolados clínicos de *Escherichia coli* produtoras de ESBLs de 2004, os isolados nº 12, 36 e 39 (12%) apresentaram o gene *qnrS* (Figura nº 15 e tabela nº 4).

A				B				
Isolado	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>	Isolado	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>	
47	nd*	nd	nd	04	nd	nd	nd	
48	nd	nd	nd	07	nd	nd	nd	
49	nd	nd	nd	12	nd	nd	POS	
51	nd	nd	POS <sup>#</sup>	18	nd	nd	nd	
88	nd	nd	nd	19	nd	nd	nd	
89	nd	nd	POS	20	nd	nd	nd	
94	nd	nd	nd	21	nd	nd	nd	
97	nd	nd	nd	22	nd	nd	nd	
105	nd	nd	nd	27	nd	nd	nd	
109	nd	nd	nd	28	nd	nd	nd	
118	nd	nd	nd	29	nd	nd	nd	
131	nd	nd	nd	30	nd	nd	nd	
139	nd	nd	nd	31	nd	nd	nd	
154	nd	nd	nd	32	nd	nd	nd	
161	nd	nd	nd	33	nd	nd	nd	
243	nd	nd	nd	34	nd	nd	nd	
250	nd	nd	nd	36	nd	nd	POS	
269	nd	nd	nd	37	nd	nd	nd	
300	nd	nd	nd	38	nd	nd	nd	
313	nd	nd	nd	39	nd	nd	POS	
378	nd	nd	nd	40	nd	nd	nd	
403	nd	nd	nd	41	nd	nd	nd	
408	nd	nd	nd	42	nd	nd	nd	
413	nd	nd	nd	43	nd	nd	nd	
419	nd	nd	nd	45	nd	nd	nd	
420	nd	nd	nd					
449	nd	nd	nd					
463	nd	nd	nd					
467	nd	nd	nd					
Total:	29	0	0	2	25	0	0	2

Tabela nº 4: Prevalência dos genes *qnrA*, *qnrB* e *qnrS* nos isolados clínicos de *Escherichia coli* envolvidos neste estudo. Legenda: A = isolados recolhidos em Novembro e Dezembro de 2007. B = isolados recolhidos em 2004. nd\* = gene não detectado, POS<sup>#</sup> = gene detectado

#### 8. 4 Análise da Sequência Parcial de Nucleótidos do Gene *qnrS*

O produto de amplificação obtido pela técnica de PCR com os *primers qnrS* em que o tamanho esperado era 417bp do isolado 89, foi sequenciado e resultou numa sequência de 417 nucleótidos (ver Figura nº 16).

```
121  CGACATTCGTCAACTGCAAGTTCATTGAACAGGGTGATATCGAAGGCTGCCACTTTGATG
181  TCGCAGATCTTCGTGATGCAAGTTTCCAACAATGCCAACTTGCATGGCAAACCTTCAGTA
241  ATGCCAATTGCTACGGTATAGAGTTCCGTGCGTGTGATTTAAAAGGTGCCAACTTTTCCC
301  GAACAAACTTTGCCCATCAAGTGAGTAATCGTATGTACTTTTCTCAGCATTTATTTCTG
361  GATGTAATCTTTCTATGCCAATATGGAGAGGGTTTGTGTTAGAAAAATGTGAGTTGTTTG
421  AAAATCGCTGGATAGGAACGAACCTAGCGGGTGCATCACTGAAAGAGTCAGACTTAAGTC
481  GAGGTGTTTTTTCCGAAGATGTCTGGGGGCAATTTAGCCTACAGGGTGCCAATTTA
```

Figura nº 16: Sequência de nucleótidos do gene *qnrS* obtidos por sequenciação. Os vinte nucleótidos iniciais e finais (em azul) correspondem ao *primer Forward* e complemento do *primer Reverse*, respectivamente. O tamanho do gene *qnrS1* inteiro é de 654bp.

Esta sequência de nucleótidos foi comparada com sequências existentes na base de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). A análise das sequências confirmou que o fragmento de DNA sequenciado corresponde ao segmento compreendido entre a posição 120 a 537 do gene *qnrS* e apresentou 100% de homologia com o mesmo.

#### 8. 5 Produção de $\beta$ -lactamases de Espectro Alargado Associado à Resistência às Quinolonas em *Enterobacteriaceae*

As  $\beta$ -lactamases de Espectro Alargado (ESBLs) formam um grupo de enzimas capazes de hidrolisar o anel  $\beta$ -lactâmico das cefalosporinas de amplo espectro. Estas têm a sua origem nas  $\beta$ -lactamases clássicas TEM-1, TEM-2 e SHV-1. A produção de ESBLs é mediada por plasmídeos e, como tal, representa motivo de sérias preocupações acerca do futuro da antibioterapia, pois os mesmos podem facilmente ser disseminados entre as bactérias. Normalmente estes plasmídeos conferem resistência para várias classes de antibacterianos simultaneamente, como quinolonas, aminoglicosídeos e sulfonamidas, somado aos  $\beta$ -lactâmicos (Sousa M. A. J. et al, 2004).

Para além de representarem uma séria ameaça ao futuro da antibioterapia, já na actualidade representam um grave dilema quando se trata de escolher o tratamento

adequado para curar uma infecção. Esta escolha deixou de ser uma tarefa simples, pois os microrganismos resistentes deixaram de ser um problema restrito às unidades hospitalares de alto risco como por exemplo as unidades de terapia intensiva. Agora estão presentes até mesmo na comunidade. Portanto, esta realidade exige uma preparação mais aprofundada por parte de quem prescreve os medicamentos além da necessidade de terem consciência da sua contribuição na informação e educação da população em relação ao uso correcto e controlado dos antibacterianos.

O aparecimento de *E. coli* em infecções adquiridas na comunidade expressando resistência às quinolonas simultaneamente com a produção de ESBLs, especialmente as do tipo CTX-M, está a tornar-se um problema cada vez mais frequente. Como as quinolonas e os  $\beta$ -lactâmicos são duas classes de antibacterianos considerados de primeira escolha no tratamento de infecções causadas por *E. coli* adquiridas na comunidade, a eficácia garantida destes tratamentos está ameaçada.

Um estudo realizado no Reino Unido (UK) com *Enterobacteriaceae* evidenciou que 89,4% dos isolados que produziam ESBLs tipo CTX-M também eram resistentes à ciprofloxacina. Níveis elevados de resistência à ciprofloxacina (48,3%) também foram observados em *Enterobacteriaceae* que produziam outros tipos de ESBLs. A associação dos mecanismos de resistência às quinolonas com a produção de ESBLs, especialmente as do tipo CTX-M, ainda não foi desvendado (Denton M., 2007).

O uso dos antibacterianos têm sido cada vez mais reconhecido como a principal pressão selectiva que conduz as bactérias a desenvolver mecanismos de resistência aos mesmos.

Nesta perspectiva, se avaliarmos a intensidade do uso das quinolonas e cefalosporinas em Portugal, podemos notar que se tratam de duas classes de antibacterianos amplamente usadas e as estatísticas de resistência bacteriana a estes medicamentos são significativamente elevadas (ver Figura nº 9 na pag. 58).

Segundo cálculos do Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento (INFARMED), a percentagem de uso de quinolonas e cefalosporinas em relação ao total de antibacterianos usados em Portugal ao nível de ambulatório, varia de ano para ano. Além disso, esta percentagem não varia necessariamente de forma linear, e nem se verifica um aumento ou decréscimo contínuo ao longo dos anos. Como exemplo, citam-se as estatísticas de uso das quinolonas de 2002 a 2007, 14,9%, 12,3%, 13,6%, 12,7%, 14,6% e

13,5%, respectivamente. As cefalosporinas por sua vez correspondiam no mesmo período a 12,6%, 15%, 14,5%, 14%, 13,3% e 10,5%, respectivamente. ([www.acs.min-saude.pt/pns/pt/asecibilidade-ao-medicamento](http://www.acs.min-saude.pt/pns/pt/asecibilidade-ao-medicamento)).

Em análise aos dados do programa ESAC, Portugal aparece em quarto lugar na lista do consumo de antibacterianos, embora tenha-se registado uma diminuição de 7,4% no uso dos mesmos de 2005 para 2006 (Ferech, M., et al, 2006).

Como um possível reflexo deste uso intenso de antibacterianos no país, entre o total de isolados clínicos de *E. coli* de 2007 (n=220) envolvidos no presente estudo, 10% eram produtores de ESBLs e todos estes por sua vez, apresentaram resistência à ciprofloxacina e levofloxacina. Dentre os 10% produtores de ESBLs, 90% também apresentaram resistência à gentamicina.

Entre os mecanismos de resistência às quinolonas, as proteínas do tipo Qnr têm sido largamente estudadas nos últimos anos e há vários trabalhos evidenciando a associação das mesmas à produção de ESBLs (Oktem I. M. A., et al, (2008), Robicsek A. et al, (2006<sup>b</sup>), Ellitongto M. J., et al, (2007), Cattoir V., et al, (2007<sup>a</sup>), Corkill J. E. et al, (2005), Lavigne J. P., et al, (2006), Jiang Y., et al, (2008), entre outros).

Em um estudo realizado na UK numa colecção de isolados clínicos de *Enterobacteriaceae* resistentes à ciprofloxacina e cefotaxima, 32% continham *qnrA* e destes, 73,3% também produziam SHV-12. Os autores deste estudo acreditam que os mecanismos de resistência responsáveis pela expressão de resistência aos dois antibacterianos simultaneamente estavam localizados no mesmo plasmídeo (Corkill J. E. et al, 2005).

Recentemente, foi realizada uma pesquisa na França que mostrou que 7,7% das *E. coli* produtoras de ESBLs tinham *qnrA* no mesmo plasmídeo (Lavigne J. P., et al, 2006)

No princípio, somente as proteínas QnrA e QnrB foram associados à produção de ESBLs, no entanto, em estudos mais recentes as proteínas QnrS também foram associadas com a produção de ESBLs, especialmente as do tipo CTX-M. Como é o exemplo do estudo realizado na China em que o gene *qnrS* foi detectado em 2,5% de *E. coli* e *K. pneumoniae* produtoras de ESBLs. Todos estes 2,5% produziam ESBLs do tipo CTX-M. Alguns destes isolados também produziam outras  $\beta$ -lactamases em simultâneo, como TEM-1 e as do tipo SHV (Jiang Y., et al, 2008).

Neste trabalho, a detecção de ESBLs foi realizada pelo método fenotípico conforme descrito em Materiais e Métodos. Este método sugere o tipo de ESBL produzida com uma boa margem de confiança. Quando a ceftazidima é o antibacteriano melhor hidrolisado, o tipo de ESBL produzido é provavelmente uma TEM-derivada (no caso de *E. coli*) mas também pode ser uma do tipo-SHV. Quando a cefotaxima é o antibacteriano melhor hidrolisado, o tipo de ESBL produzido é provavelmente uma CTX-M. Em caso de ambos serem bem hidrolisados (CAZ E CTX), pode haver produção de duas ESBLs simultaneamente ou tratar-se de alguns tipos de CTX-M que hidrolisam bem os dois antibacterianos. Assim, segundo estes critérios de interpretação, o isolado nº89 (ver Figura nº17), provavelmente produz uma ESBL do tipo CTX-M, enquanto que o isolado 51 não produz ESBLs.

Nos isolados clínicos nº 12, 36 e 39 de 2004, já havia sido realizada pesquisa de ESBLs através de amplificação dos genes codificadores. A ESBL produzida pelos três isolados (clones) era a CTX-M-15.

Neste trabalho, o gene *qnrS* (único detectado) não apresentou uma relação significativa com a produção de ESBLs. Nos isolados de *E. coli* de 2007, obtivemos amplificação do gene *qnrS* num isolado produtor de ESBLs e noutro isolado não-produtor de ESBLs, isolados nº 89 e nº 51, respectivamente.

Os isolados clínicos de 2004 representavam um grupo de *E. coli* produtoras de ESBLs e, no entanto, a prevalência do gene *qnrS* apresentou-se numa percentagem pouco superior à prevalência da colecção mista de *E. coli* de 2007. Este resultado provavelmente não seria muito diferente actualmente, se considerarmos que o uso de cefalosporinas em Portugal diminuiu desde 2004 para 2007 ([http://www.esac.ua.ac.be/main.aspx?c=\\*ESAC2&n=50039](http://www.esac.ua.ac.be/main.aspx?c=*ESAC2&n=50039)).

Em contrapartida, quando o gene *qnrS* era detectado num microrganismo produtor de ESBLs, tratava-se do tipo CTX-M em todos os casos.

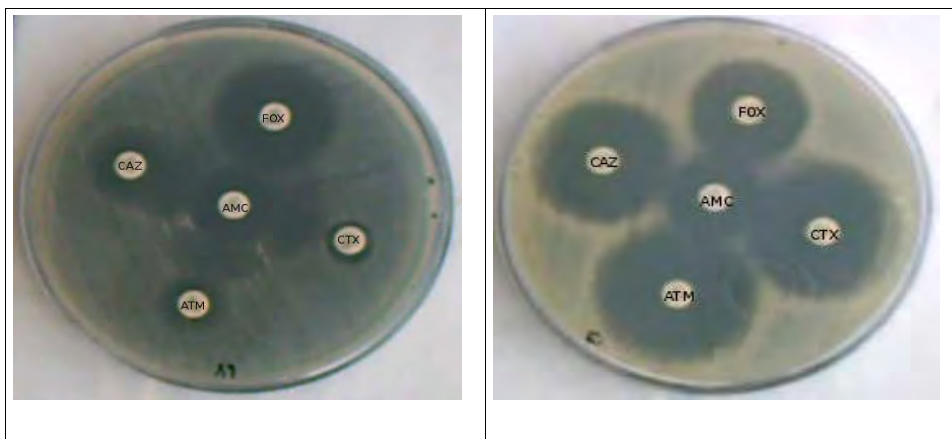


Figura nº 17: Detecção fenotípica de Beta-lactamases de Espectro Alargado nos isolados clínicos de *Escherichia coli qnrS* positivo. A foto da esquerda corresponde ao isolado clínico nº 89 que provavelmente é produtor de uma beta-lactamase provavelmente, do tipo CTX-M. A foto da direita corresponde ao isolado nº 51 que não é produtor de Beta-lactamases de Espectro Alargado.

## 8. 6 Estudo da Relação Clonal dos Isolados Clínicos de *Escherichia coli*

A identificação e a classificação dos microrganismos são de crucial importância nos estudos da diversidade microbiana nos diferentes contextos como na investigação científica, medicina, indústria, agricultura e meio ambiente, entre outros. Um grande número de diferentes métodos fenotípicos e genotípicos estão a ser utilizados actualmente para este fim. Cada um desses métodos permite um certo nível de identificação filogenética como género, espécie, subespécie ou estirpe. No entanto, cada método tem suas vantagens e desvantagens no que concerne à fácil aplicação, reprodutibilidade, uso de equipamentos e nível de resolução (Versalovic J. et al, 1991).

Com particular interesse em epidemiologia clínica é a aplicação destas técnicas na aquisição de informação sobre a disseminação de microrganismos resistentes a múltiplos antibióticos. O estudo da epidemiologia molecular da resistência aos antibióticos em microrganismos permite conhecer a relação clonal entre os isolados resistentes e avaliar a transferência horizontal de determinantes de resistência (Silva G. C. D. J. 2002).

Embora os métodos de identificação genotípica estejam a emergir como sendo mais confiáveis, mais simples e mais rápidos, as metodologias de identificação fenotípicas ainda têm grande importância na prática clínica diária, sendo a abordagem de primeira escolha por se tratar de métodos bem padronizados, de baixo custo, fáceis de serem executados e

terem disponíveis critérios de interpretação bem definidos. Além disso, são capazes de identificar alguns microrganismos até ao nível da espécie.

Neste trabalho, os métodos fenotípicos foram utilizados tanto na identificação das bactérias ao nível de espécie, quanto para identificar o perfil de susceptibilidade aos antibacterianos. Este conjunto de informações permitiu a classificação dos isolados clínicos de *E. coli* resistentes às quinolonas em cinco grupos fenotípicos diferentes: grupo I, grupo II, grupo III, grupo IV e grupo V (descrito em materiais e métodos), o que sugere a existência de no mínimo cinco clones diferentes no HUC, durante o período de recolha (um mês).

Tendo em conta a importância de se conhecer, no contexto clínico, se o fenótipo da resistência aos antibacterianos se deve à transmissão horizontal de mecanismos de resistência entre estirpes diferentes ou à simples transmissão nosocomial de uma única estirpe, procedeu-se à tipagem destes microrganismos.

De modo a identificar a relação genética entre os isolados clínicos de *E. coli*, foi utilizado neste trabalho o método molecular de tipagem denominado ERIC-PCR (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus sequences*).

Este método identifica de forma bastante fiável as enterobactérias Gram-negativo ao nível de estirpe, directamente através da amplificação por PCR de sequências repetitivas altamente conservadas do seu DNA genómico, produzindo uma impressão digital única para cada estirpe e que pode ser avaliada após electroforese em gel de agarose (Versalovic J. et al, 1991).

### **8. 6. 1 Análise dos Perfis Obtidos por ERIC-PCR**

Os perfis obtidos a partir de separação dos fragmentos de DNA (amplificados por ERIC-PCR) em gel de agarose podem em geral ser analisadas por distinções de padrões baseados em bandas e em curvas. O último só pode ser realizado através de programas computacionais. Há vários programas de análise de perfis informatizados, entre os quais, o AMBIS e o GelCompar (Versalovic J. et al, 1991).

A análise com base em bandas ou numa sequência de curvas pela posição dos picos, sozinha ou combinada com a área e altura de cada curva, servem para caracterizar um perfil bem definido e de baixa complexidade. Usando um método com base em

bandas, a colecção de perfis analisada pode ser descrita como uma matriz de variáveis binárias, banda presente =1, banda ausente= 0 (Versalovic J. et al, 1991).

Os padrões das bandas podem ser analisadas manualmente ou por programas informatizados.

Métodos de análise baseados em bandas muitas vezes requerem diferenciações laboriosas e tediosas, além de revisões atentas e os resultados podem ser subjectivos por natureza.

Informações contidas em perfis de alta complexidade, tais como os perfis genómicos produzidas por rep-PCR (grupo no qual se insere o ERIC-PCR) incluem não somente o número e posição de bandas ou picos de curvas, mas também a área e a densitometria, bem como as diferentes razões entre área e altura das curvas. Por essa razão, um sistema binário de análise não é o suficiente para descrever padrões de alta complexidade destes perfis. Preferencialmente, devem ser analisados usando um protocolo com base em curvas (informatizado). A total complexidade de perfis genómicos desta natureza só podem ser completamente caracterizadas através de curvas densitométricas descritas como um conjunto sequencial de valores de densitometria (Versalovic J. et al, 1991).

A análise dos perfis genómicos gerados por rep-PCR, normalmente requer uma simplificação dos dados originais que podem ser utilizados para calcular a matriz de proximidade. Este cálculo tanto pode ser baseado em critérios de similaridade. Estas similaridades podem ser estabelecidas usando um conjunto de coeficientes. A comparação baseada em bandas usando o coeficiente de similaridade definido por Jacard (1908) é baseado na somente na presença de uma banda e a sua posição como uma variável binária. A derivação de coeficiente feita por Dice (1945) também usa a posição da banda, mas adiciona mais o peso molecular para fazer a relação entre as bandas. Um coeficiente de similaridade mais sofisticado sensível à área, deve considerar além da correspondência expressa pelas bandas, a área ocupada e os valores densitométricos gerados pelo perfil. O coeficiente de correlação de Pearson abrange estas três variáveis, portanto é o mais indicado a ser usado (Versalovic J. et al, 1991).

Neste trabalho, as reacções de ERIC-PCR foram realizadas em quatro ensaios separados sob as mesmas condições. O DNA molde usado foi obtido através de extracção por Kit, pois quando utilizado DNA obtido por ebulição da amostra a técnica não se



mostrou muito reprodutível. Obteve-se perfis com fragmentos de DNA distintos, a maioria localizados ente 250 bp e 2500 bp (Figuras nº 18, 19 e 20).

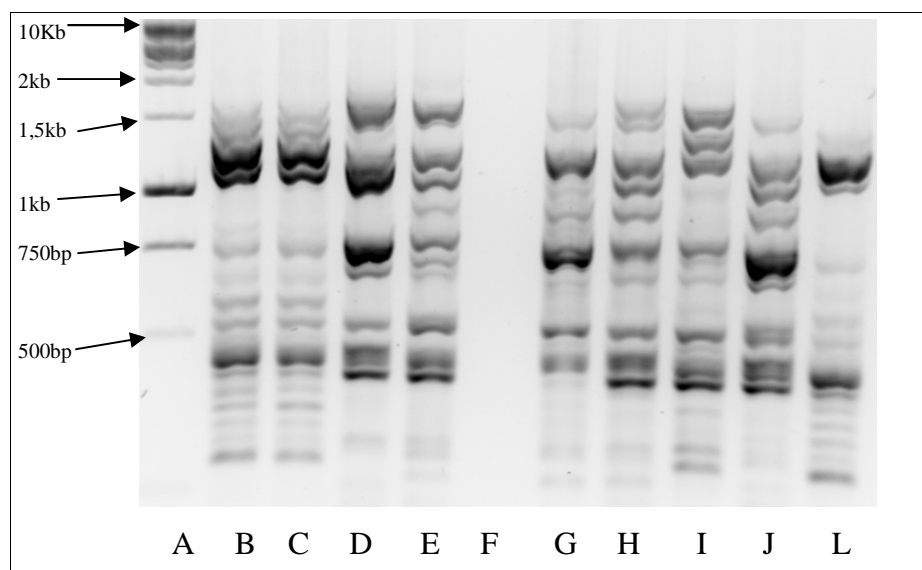


Figura nº 18: Perfis de DNA obtidos pela técnica de ERIC-PCR de isolados clínicos de *Escherichia coli* resistentes à ciprofloxacina e levofloxacina. Coluna A, marcador de peso molecular (BIORON); coluna B a E, isolados 47, 49, 88 e 89 respectivamente. Coluna F, controlo negativo. Colunas G a H, 105, 109, 131, 154 e 161, respectivamente. Electroforese em gel de agarose a 2 % realizada conforme descrito em Materiais e Métodos.

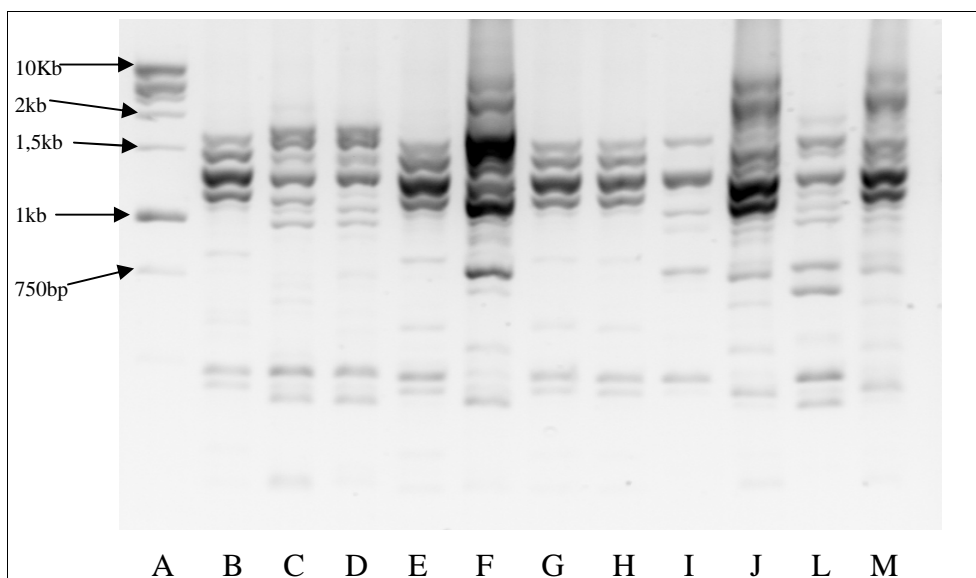


Figura nº 19: Perfis de DNA obtidos pela técnica de ERIC-PCR de isolados clínicos de *Escherichia coli* resistentes à ciprofloxacina e levofloxacina. Coluna A, marcador de peso molecular(BIORON). Colunas B a M, 250, 298, 313, 378, 403, 408, 419, 420, 449, 467 e 94 respectivamente. Coluna N, controlo negativo. Electroforese em gel de agarose a 2 % realizada conforme descrito em Materiais e Métodos.

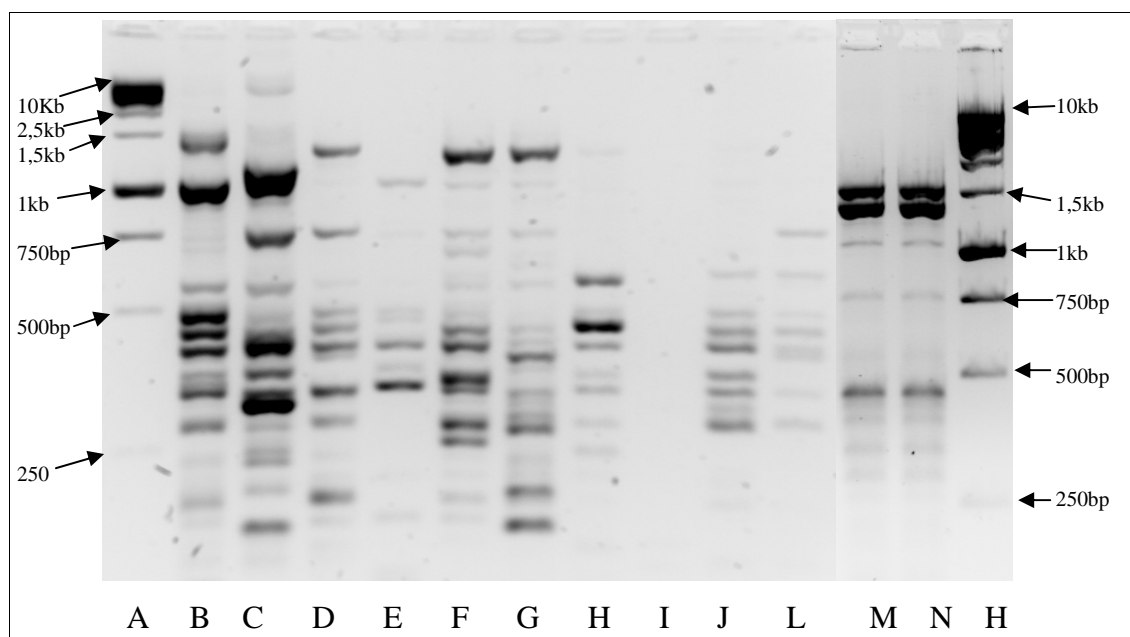


Figura nº 20: Perfis de DNA obtidos por ERIC-PCR de isolados clínicos de *Escherichia coli* sensíveis à ciprofloxacina e levofloxacina (excepto o coluna C, M e N ). Coluna A e H, marcador de peso molecular de 1kb(BIORN). Colunas B a H, isolados 48, 51, 97, 118, 139, 243 e 269, respectivamente. Coluna I, controlo negativo. Colunas J, L, M e N isolados 412, 463, 36 e 39, respectivamente.

A análise e comparação dos perfis foram realizadas através do software GelCompar II. A comparação de todos os perfis em conjunto deu origem a um dendrograma (Figura nº 21).

Os padrões dos perfis foram classificados com base no grau de similaridade calculado pelo GelCompar e critérios de análise descritos por Tenover et al (1997). As terminologias utilizadas foram: indistinguíveis, geneticamente relacionadas, possivelmente relacionadas e diferentes.

No dendrograma (Figura nº 21) podem ser observados 22 padrões nitidamente distinguíveis entre os 31 perfis comparados, considerando 80% de similaridade. Também se observou a formação de dois agrupamentos distintos dos isolados clínicos de *E. coli*. No grupo I a percentagem de similaridade entre todos os componentes é inferior a 70%, portanto são diferentes entre si. Pertencem a este agrupamento os isolados clínicos que se apresentaram fenotipicamente sensíveis a ciprofloxacina.

No grupo II estão agrupados os isolados clínicos que se mostraram fenotipicamente resistentes ou intermédios à ciprofloxacina. Entre estes isolados, pode-se observar um grau de similaridade maior em alguns casos, como por exemplo: os isolados 36 e 39

apresentam similaridade próxima de 100% sem apresentarem bandas diferentes, sendo portanto classificados como indistinguíveis. Os isolados 47 e 49, 378, 408 e 419 apresentam grau de similaridade maior que 90 entre si. São classificados como geneticamente relacionados (grupo IIa). Os isolados 250 e 94 apresentam uma similaridade superior a 82% com os isolados do grupo IIa, pelo que estão possivelmente relacionados geneticamente com estes. Com similaridade de aproximadamente 92%, os isolados 298 e 313 também são geneticamente relacionados (grupo IIb). Os isolados 89 e 109 estão também provavelmente relacionados geneticamente, com cerca de 80% de similaridade, embora só no isolado 89 se tenha detectado *qnrS*. Todos os demais isolados apresentaram similaridade menor que 70% com diferenças nas bandas, sendo classificados como diferentes (Figuras nº 18, 19, 20 e 21).

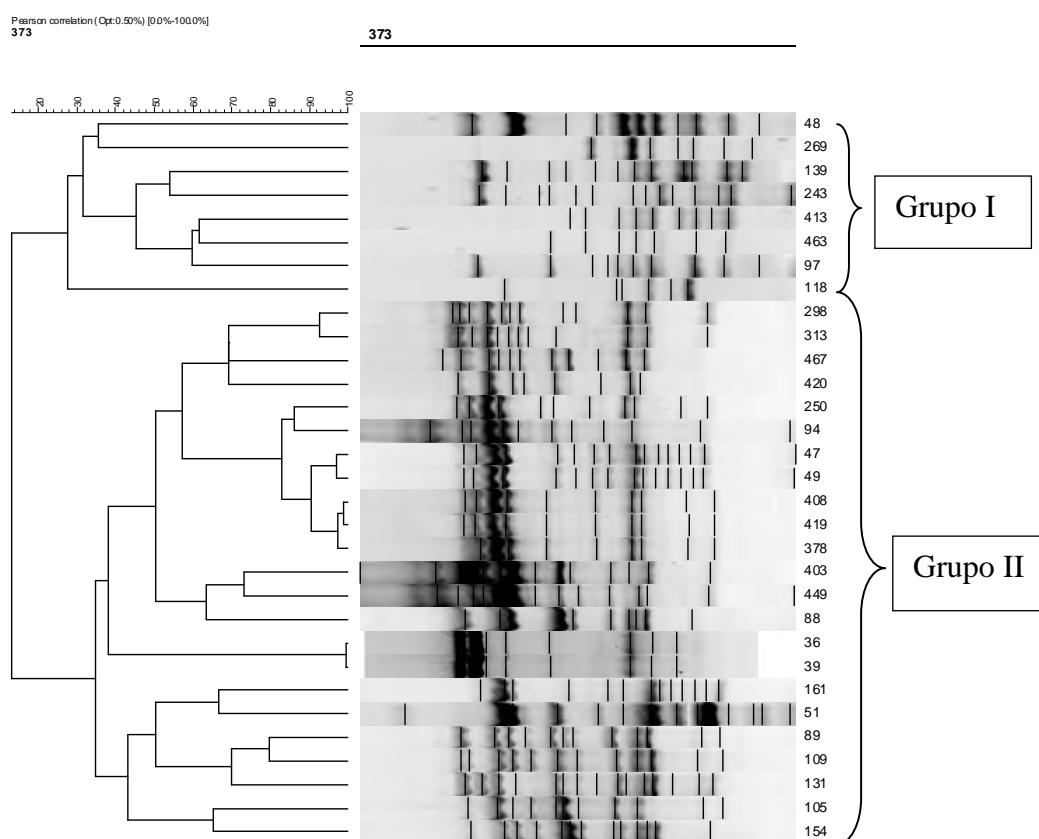


Figura nº 21: dendrograma baseado em *unweighted pair group method* com aplicação de média aritméticas em *cluster analysis* dos padrões das impressões digitais dos isolados de *Escherichia coli* obtidos por ERIC-PCR. Verifica-se a formação de dois grupos bem distintos. No grupo I estão aglomeradas as impressões digitais de isolados clínicos sensíveis à ciprofloxacina e no grupo II, os isolados resistentes e intermédios à ciprofloxacina. As impressões digitais do primeiro grupo são todas diferentes. No grupo II observa-se impressões digitais indistinguíveis, nomeadamente os isolados 36 e 39, 47 e 49, 378, 408 e 419, respectivamente.

Os isolados clínicos nº 47 e 49 são provenientes da mesma enfermaria (Medicina I), de pacientes diferentes, recolhidos em dias sucessivos (Tabela nº 3) e apresentam antibiogramas iguais. Em contrapartida, os isolados 378, 408 e 419, provêm respectivamente das enfermarias de Neurotraumatologia, Medicina II e Urgências, apresentam antibiogramas diferentes e foram isolados em datas mais distantes (diferença de 10 dias).

Entre os isolados clínicos de *E. coli* de 2007 que apresentaram o gene *qnrS* (nº 89 e 51), o grau de similaridade foi inferior a 50%, portanto não se tratava do mesmo clone. Já entre os isolados de *E. coli* da colecção de 2004 que apresentaram o gene *qnrS* (isolados nº12, 36 e 39), foi verificado que se tratava de disseminação clonal. O grau de similaridade entre os isolados de *E. coli* que apresentaram o gene *qnrS* de 2004 e 2007 foi inferior a 40%, portanto, diferentes.

Face a estas observações, pode verificar-se que a prevalência de genes *qnrS* nos isolados clínicos representativos de 2007, não está relacionada com a disseminação clonal. O contrário pode ser observado nos isolados recolhidos em 2004 (colecção de produtores de ESBLs), em que todos pertenciam ao mesmo clone. Provavelmente, a diferença dos resultados está relacionada com o facto das duas colecções serem muito diferentes entre si. A de 2007, é uma colecção mista de *E. coli* recolhidas indiscriminadamente durante o período de um mês e a de 2004, é uma colecção composta somente de *E. coli* produtoras de ESBLs. Como o clone de *E. coli* de 2004 que possuía o gene *qnrS*, também era produtor de CTX-M-15, a selecção deste pode estar associada com o uso intenso de cefalosporinas em ambiente hospitalar. O gene *qnrS* pode ter sido mantido por estar localizado no mesmo plasmídeo.

Normalmente, os mecanismos de resistência às quinolonas não estão associados à disseminação clonal, sendo mais provável o envolvimento de transferência horizontal de genes de resistência e a existência de um reservatório comum destes genes na natureza (Robicsek et al, 2006<sup>a</sup>).

## **8. 7 Pesquisa de Plasmídeos, Conjugação *in vitro* e determinação da Concentração Mínima Inibitória dos Transconjugantes**

### **8. 7. 1 Pesquisa de Plasmídeos**

Os plasmídeos são elementos genéticos móveis que desempenham um papel

importante na transferência horizontal de genes que codificam resistência aos antibacterianos. Por esta razão, quando um gene codificador de resistência está localizado em plasmídeos, a sua presença numa determinada espécie ou família de bactérias se torna muito mais preocupante, pois pode ser disseminado para outras famílias. É de conhecimento, que os genes *qnr* estão localizados em plasmídeos, portanto são passíveis de serem disseminados entre as bactérias.

Como no estudo da relação genética dos isolados clínicos de *E. coli* recolhidos em 2007, que serviram para pesquisa dos genes *qnr*, ficou esclarecido que a prevalência do gene *qnrS* não estava associada á disseminação clonal, procedeu-se à pesquisa de plasmídeos (Figura nº 22).

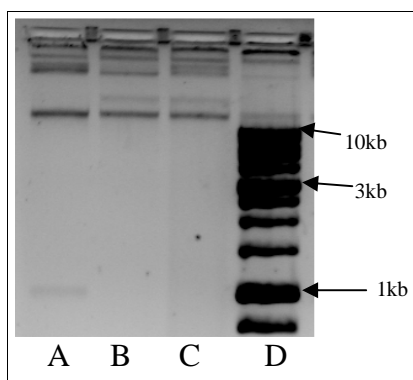


Figura nº 22: Extracção de plasmídeos através do método de Birnboim & Doly (1975), dos isolados clínicos de *Escherichia coli* nos quais foi detectado o gene *qnrS*. Na coluna C se encontra o isolado nº 39 (isolados 12, 36 e 39 são clones), na coluna A e B, nº 51 e 89, respectivamente. Na coluna D se encontra o marcador de peso molecular de 1Kb (BIORON). Foram colocados em cada poço, 3µl de DNA diluídos em 15µl de água e *loader*. Electroforese foi realizada em gel de agarose a 1%, durante 3h.

Como pode ser observado na figura nº 22, todos os isolados clínicos de *E. coli* nos quais foi detectado o gene *qnrS*, têm plasmídeos de alto peso molecular de igual tamanho. O isolado nº 89 também apresenta um plasmídeo de baixo peso molecular. Isto, associado ao facto de ter sido detectado somente o gene *qnrS* (entre os três, *qnrA*, *qnrB* e *qnrS*), tanto nos isolados de 2004 quanto nos de 2007, sugere que a prevalência deste gene nos isolados de *E. coli* do HUC ao longo dos anos, está relacionada com a disseminação horizontal de DNA.

#### 8. 7. 2 Conjugação *in vitro* do gene *qnrS* e determinação da Concentração Mínima Inibitória dos Transconjugantes

Uma vez detectados plasmídeos de igual tamanho em todos os isolados que tinham

o gene *qnrS*, procedeu-se à conjugação *in vitro* para avaliar a transferência horizontal deste gene entre os isolados clínicos de *E. coli*, recolhidos no HUC.

Todas as estirpes dadoras (39, 51 e 89) transferiram o gene *qnrS* à receptora (*E. coli* J53 Az<sup>R</sup>). O isolado 39 representou também os isolados 12 e 51 (mesmo clone). Pode-se concluir, desta forma, que o gene *qnrS* está localizado em plasmídeos conjugativos em todos os isolados.

Posterior à conjugação, o gene *qnrS* foi detectado nos transconjugantes através de PCR. Para verificar se a presença deste gene, isoladamente, confere algum grau de resistência à ciprofloxacina, determinou-se a CMI dos transconjugantes e da receptora (Tabela nº 5).

Isolado	CMI da ciprofloxacina
receptora J53 Az <sup>R</sup>	0,062µg/ml
transconjugante 39	1µg/ml
transconjugante 39	1µg/ml
transconjugante 51	1µg/ml

Tabela nº 5: Determinação da Concentração Mínima Inibitória da ciprofloxacina nos transconjugantes e na receptora.

Como pode ser observado na tabela nº 5 a CMI dos transconjugantes aumentou em 16x (em relação à receptora). Embora se tenha registado este aumento da CMI, os transconjugantes permanecem sensíveis à ciprofloxacina, pois somente são resistentes as bactérias que apresentam CMI  $\geq 4\mu\text{g/ml}$ . Isto significa que a presença isolada do gene *qnrS* não confere resistência à ciprofloxacina. Para uma bactéria ser resistente à ciprofloxacina, tem que apresentar em simultâneo, outro mecanismo de resistência a este fármaco.

## 9. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Na análise do perfil de susceptibilidade aos antibacterianos dos isolados clínicos de *E. coli* (recolhidos em 2007), foram verificadas altas percentagens de resistência às penicilinas, quinolonas e cefalosporinas. Este facto, provavelmente, reflecte o uso intenso destas classes de antibacterianos nos HUC. Também foi observada uma alta percentagem de isolados multirresistentes. A detecção de uma alta prevalência de isolados resistentes às quinolonas, provenientes de pacientes da comunidade, também foi registada.

Como é conhecido, o tratamento de pacientes com infecções causadas por microrganismos resistentes às quinolonas e com produção de ESBLs simultaneamente fica limitado a poucos agentes antibacterianos de largo espectro, os quais também podem vir a falhar mediante o desenvolvimento de resistências pelos microrganismos. As medidas básicas de prevenção do aparecimento de resistência bacteriana e disseminação de estirpes resistentes consistem, basicamente na adopção de medidas de desinfeção, no reforço das técnicas assépticas, no isolamento de doentes infectados com microrganismos multirresistentes, no uso mais regulamentado e consciente dos antibacterianos, na adopção de políticas de saúde pública que englobem a prevenção da disseminação de microrganismos resistentes, na criação de programas educativos sobre o uso dos antibacterianos, na criação de programas de vigilância do consumo de antibacterianos e de resistência bacteriana, entre outros.

Na pesquisa dos genes *qnr* deste estudo, foi detectado somente o gene *qnrS*, tanto na colecção de 2004, quanto na colecção de 2007. Sua prevalência apresentou-se relativamente baixa e constante, o que está de acordo com outros resultados publicados. Neste estudo, não foi identificada uma relação significativa da produção de ESBLs em simultâneo com a presença do gene *qnrS*. A associação dos genes *qnr* com a produção de ESBLs tem sido relatada com frequência.

No estudo da relação genética dos isolados clínicos de 2007 (que serviram para pesquisa dos genes *qnr*), foram encontrados dois grupos genéticos distintos. No grupo I, se aglomeraram os isolados sensíveis à ciprofloxacina que apresentaram grau de similaridade inferior a 95%, sendo considerados como geneticamente diferentes entre si. No grupo II, se agruparam os isolados resistentes e intermédios à ciprofloxacina. Já neste grupo, observou-se a presença de isolados geneticamente indistinguíveis (clones). Também se observou que

a prevalência do gene *qnrS* nos isolados de 2007 não está relacionada com disseminação clonal. O contrário foi registado nos isolados produtores de ESBLs, recolhidos em 2004. Esta diferença pode estar associada à pressão selectiva exercida pelo uso das cefalosporinas em ambiente hospitalar e o gene *qnrS* pode ter sido mantido por estar localizado no mesmo plasmídeo.

Na análise da relação da transferência horizontal de material genético na prevalência do gene *qnrS*, observou-se que os isolados que possuem o gene em questão apresentaram plasmídeos de igual tamanho. Além disso, nos ensaios de conjugação, todas as estirpes dadoras transferiram o gene *qnrS* para a estirpe receptora. Conclui-se portanto, que o gene *qnrS* está localizado em plasmídeos conjugativos e que a sua prevalência entre os isolados clínicos de *E. coli* provenientes dos HUC, pode estar associada à transferência horizontal de genes.

Na avaliação da CMI da ciprofloxacina nos transconjugantes, registou-se um aumento da mesma em 16 vezes. Apesar deste aumento (em relação à receptora), os transconjugantes continuaram sensíveis, sendo portanto, a presença isolada do gene *qnrS*, insuficiente para conferir resistência à ciprofloxacina. Neste estudo, não foi avaliada a associação do gene *qnrS* com outros mecanismos de resistência às quinolonas.

Para dar continuidade a este trabalho, no futuro seria interessante:

- estudar o ambiente genético do gene *qnrS*. Investigar se as ESBLs têm alguma influência na expressão deste gene, nos isolados produtores destas enzimas;
- pesquisar outros mecanismos de resistência às quinolonas existentes nos isolados clínicos de *E. coli*, resistentes à ciprofloxacina e levofloxacina;
- investigar a prevalência dos genes *qnr* em *Enterobacteriaceae* em geral e testar se os plasmídeos que lhe servem de suporte, também podem ser transferidos para *E. coli*;
- pesquisar bactérias do meio ambiente (especialmente o aquático) para verificar se há ocorrência de resistência às quinolonas e se os mecanismos responsáveis podem ser transferidos para *E. coli*;
- estudar se há relação das resistências às quinolonas em bactérias de interesse clínico, com uso dos antibacterianos dessa classe na veterinária e como factores de crescimento animal;
- do ponto de vista clínico, seria importante investigar a percepção que os profissionais da saúde têm acerca da resistência bacteriana, com o intuito de auxiliar a promoção de



programas de educativos relacionados ao uso mais racional dos antibacterianos, visando amenizar a disseminação dos mecanismos de resistência entre os microrganismos de interesse clínico.

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aarestrup F. M, (2006). **Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin**. ASM Press, Washington, D.C.

Canas W. F. & Souza J. C. F. (2000) **Microbiologia**. Volume 1. Editora Lidel.

Cattoir V., Poirel L. Rotimi V., et al., (2007<sup>a</sup>). **Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates**. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 60: 394-7.

Cattoir V., Poirel L. Rotimi V., et al., (2007<sup>b</sup>). ***Vibrio splendidus* as the source of plasmid-mediated QnrS-like quinolone resistance determinants**. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 51: 2650-1.

Cattoir V, Poirel L, Aubert C, et al, (2008). **Unexpected occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in environmental *Aeromonas spp.*** Emerging Infectious Diseases, 14:231-7.

Cesaro A, Bettoni RR, Lascols C, et al., (2008). **Low selection of topoisomerase mutants from strains of *Escherichia coli* harbouring plasmid-borne *qnr* genes**. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 61:1007-15.

CLSI. (2005). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 15<sup>th</sup> informational supplement**. Document M100-s15. Clinical and Laboratory Standart Institute, Wayne, PA.

Denton M. (2007) ***Enterobacteriaceae***. International Journal of Antimicrobial Agents, 3: 9-22.

Drlica K., Malik M., Kerns R. J., et al. (2008). **Quinolone-mediated bacterial death**. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 52: 385-92.

Ellington M. J., Hope R., Turton J. F. et al. (2007) **Detection of *qnrA* among *Enterobacteriaceae* from South-East England with extended-spectrum and high-level AmpC  $\beta$ -lactamases.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 60: 1176-8.

Ferech M., Coenen S., Malhotra-Kumar S., et al. (2006) **European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC): outpatient antibiotic use in Europe.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 58:401–7.

Gómez J. G. (2007). **Infección Urinaria por *Escherichia coli* multirresistente: impacto clínico y nuevas perspectivas.** Medicina Clínica (Barc), 129:412-3.

Hernández-Burruezo J. J., Mohamed-Balghata M. O., Martinez L. A., (2007) **Infecciones del aparato urinario.** Medicina Clínica (Barc), 129:707-15.

Iabadene H, Messai Y, Ammari H, Ramdani-Bougoussa N, Lounes S, Bakour R, Arlet G. (2008). **Dissemination of ESBL and Qnr determinants in *Enterobacter cloacae* in Algeria.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 62:133-6.

Jacoby G. Ahow N. And Waites K. B., (2003). **Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 47(2): 559-562.

Jacoby G. A., Walsh K. E., Mills M. D. (2006). ***qnrB* another plasmid-mediated gene for quinolone resistance.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 50: 1178-82.

Jacoby G., Cattoir V., Hooper D., et al. (2008). ***qnr* Gene Nomenclature.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 52:2297-99.

Jiang Y, Zhou Z, Qian Y, et al. (2008). **Plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr* and *aac(6')-Ib-cr* in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in China.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 61:1003-6.

Lavigne J. P., Marchandin H., Delmas J., et al. (2006). ***qnrA* in CTX-M producing *Escherichia coli* isolates from France.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 50:4224-28.

Minarini LA, Poirel L, Cattoir V, Darini AL, Nordmann P. (2008) **Plasmid-mediated quinolone resistance determinants among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 62:474–478.

Martinez-Martinez L., Pascual A. and Jacoby G. A., (1998). **Quinolone resistance from a transferable plasmid.** The Lancet, 351:797-9.

Nordmann P., and Poirel L., (2005). **Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in *Enterobacteriaceae*.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 56:463-469.

Oktem M. A., Gulay Z., Bicmen M., et al. (2008). ***qnrA* Prevalence in Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Positive *Enterobacteriaceae* Isolates From Turkey.** Journal of Infectious Diseases, 61:13-17.

Pereira A. S., Andrade S. S., Monteiro J., et al. (2007) **Evaluation of the susceptibility profiles, genetic similarity and presence of *qnr* genes in *Escherichia coli* resistant to ciprofloxacin in brazilian hospitals.** The Brazilian Journal of Infectious Diseases, 11: 40-3.

Picão R. C., Poirel L., Demarta A., et al. (2008) **Plasmid-mediated quinolone resistance in *Aeromonas allosaccharophila* recovered from a Swiss lake.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 62: 948-950.

Poirel L., Cattoir V. and Nordmann. (2008). **Is plasmid-mediated quinolone resistance a clinically significant problem?** Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 14: 295-7.

Poirel L., Leviandier C. and Nordmann P. (2006). **Prevalence and genetic analysis of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QnrA and QnrS in *Enterobacteriaceae* isolates from French University hospital.** Antimicrobial Agents and

Chemotherapy, 50:3992-97.

Poirel L., Rodriguez-Martinez J. M., Mammeri H. (2005). **Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrA**. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 49: 3523-25.

Robicsek A., Jacoby G. A. and Hooper D. (2006<sup>a</sup>). **The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance**. Lancet Infectious Diseases, 6: 629-40.

Robicsek A., Strahilevitz J., Sahm D. F. (2006<sup>b</sup>). **qnr prevalence in ceftazidime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from the United States**. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 50: 2872-74.

Rodríguez-Martínez JM, Velasco C, Briales A, García I, Conejo MC, Pascual A. (2008). **Qnr-like pentapeptide repeat proteins in gram-positive bacteria**. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 61:1240-3.

Silva G. C. D. J., (2002) **Resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos em Isolados Clínicos de *Acinetobacter* spp.** Tese de Doutorado.

Sanchez-Céspedes J, Blasco MD, Martí S, Alba V, Alcaide E, Esteve C, Vila J. (2008). **Plasmid-mediated QnrS2 determinant from a clinical *Aeromonas veronii* isolate**. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 52: 2990-91

Souza J. C., (2005). **Manual de Antibióticos Antibacterianos**. Universidade Fernando Pessoa, Porto.

Sousa M. A. J., Ferreira E. S. and Conceição G. C. (2004) **Betalactamases de Espectro Ampliado (ESBL): um Importante Mecanismo de Resistência Bacteriana e sua Detecção no Laboratório Clínico**. NewsLab, 63: 152-74.

Stamm, W. E. (2006) **Host-Pathogen Interactions in Community Acquired Urinary**

**Tract Infections.** Transactions of the American Clinical and Climatological Association. 117: 75-84.

Strahilevitz J., Engeltein D., Adler A., et al. (2007, **Changes in *qnr* prevalence and fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter spp.* collected from 1995 to 2005.** Antimicrobial Agents Chemotherapy, 51: 3001-03.

Tran J. H. and Jacoby, G. A., (2002). **Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance.** Proceedings of the National Academy of Sciences, 99:5638-42.

Tran J. H., Jacoby G. A. and Hooper D. (2005<sup>a</sup>). **Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance Protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 49:385-92.

Tran J. H., Jacoby G. A. and Hooper D. (2005<sup>b</sup>) **Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance Protein QnrA with *Escherichia coli* Topoisomerase IV.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 49: 3050-52.

Tenover F. C., Arbeit R. D and Goering R. V. (1997) **How to Select and Interpret Molecular Stain Typing Methods for Epidemiological Studies of Bacterial Infections: A Review for Healthcare Epidemiologist.** Infection Control and Hospital Epidemiology, 18:426-39.

Vasilaki O., Ntokou E., Ikonomidis A., et al, (2008). **Emergence of the plasmid-mediated quinolone resistance gene *qnrS1* in *Escherichia coli* genotypes in Greece.** Antimicrobial Agents Chemotherapy, 52: 2996-97.

Versalovic J., Koeuth T. and Lupski J. R., (1991). **Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes.** Nucleic Acid Research, 19: 6823-31.

Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Arakawa Y. (2008). **Plasmid-mediated *qepA* gene among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan.** Antimicrobial Agents Chemotherapy, 2:1564-6.

White D. G., et al, (2005). **Frontiers in Antimicrobial Resistance: a Tribute to Stuart B. Levy.** ASM Press, Washington, D.C.

Wang A, Yang Y, Lu Q, et al, (2008). **Presence of *qnr* gene in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* resistant to ciprofloxacin isolated from pediatric patients in China.** BMC Infectious Diseases 22:8-68.

Wang A, Yang Y, Lu Q, et al, (2008). **Occurrence of *qnr*-positive clinical isolates in *Klebsiella pneumoniae* producing ESBL or AmpC-type beta-lactamase from five pediatric hospitals in China.** FEMS Microbiology Letters, 283:112-6.

Wu J.J., Ko W.C., Wu H.M., Yan J.J., (2008). **Prevalence of Qnr determinants among bloodstream isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a Taiwanese hospital, 1999-2005.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 61:1234-9.

## Websites

Organização Mundial da Saúde (OMS), em  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>

Programa Nacional de Saúde (PNS), em  
<http://www.acs.min-saude.pt/pns/pt/assecibilidade-ao-medicamento>

European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS), em  
[http://www.rivm.nl/earss/result/Monitoring\\_reports/Annual\\_reports.jsp](http://www.rivm.nl/earss/result/Monitoring_reports/Annual_reports.jsp)

European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC), em  
[http://www.esac.ua.ac.be/main.aspx?c=\\*ESAC2&n=50039](http://www.esac.ua.ac.be/main.aspx?c=*ESAC2&n=50039)